

Aus dem Institut für Humangenetik
der medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

*Retrospektive Charakterisierung von Patienten mit mentaler Retardierung/Intelligenzminderung
aus dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Magdeburg
und molekulargenetische Aufarbeitung ausgewählter familiärer Fälle*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von	Jana Becker
aus	Rathenow
Magdeburg	2017

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Becker, Jana:

Retrospektive Charakterisierung von Patienten mit mentaler Retardierung/Intelligenzminderung aus dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Magdeburg und molekulargenetische Aufarbeitung ausgewählter familiärer Fälle. -2017.- 99 Bl., 27 Abb., 39 Tab., 11 Anl.

Kurzreferat:

Mentale Retardierung ist mit einer Häufigkeit in der Gesamtbevölkerung von 1-10% eine relativ häufig auftretende Störung. Sie verursacht 5-10% der Kosten im Gesundheitssystem und stellt damit einen wichtigen medizinischen und sozialen Faktor in unserer Gesellschaft dar. Sowohl exogene als auch genetische Ursachen sind bekannt, jedoch bleiben bislang über die Hälfte der Fälle ohne Diagnose. In den vergangenen Jahren kann durch die Weiterentwicklung molekulargenetischer Methoden ein großer Fortschritt in der Identifizierung von krankheitsverursachenden Genen verzeichnet werden. In dieser Arbeit wurden Daten und Diagnosen von 588 entwicklungsverzögerten Patienten, die in den Jahren 2000 bis 2012 im Institut für Humangenetik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg vorgestellt wurden, ausgewertet und mit Blick auf die Forschungsliteratur diskutiert. Diese Auswertung bezog sich unter anderem auf das Geschlechterverhältnis, die Altersverteilung, exogene Einflussfaktoren, Verhaltensauffälligkeiten, Veränderungen der Schädelform und Diagnostikmöglichkeiten von mentaler Retardierung. Weiterhin wurden vier ausgewählte Familien mit gehäuftem Auftreten mentaler Retardierung mithilfe moderner Methoden molekulargenetisch untersucht. Es konnten drei bereits im Zusammenhang mit mentaler Retardierung bekannte Veränderungen (Duplikation 17q11.2, Duplikation 22q11.21q11.22, Mutationen im *BRWD3*-Gen) gefunden und näher charakterisiert werden. Weiterhin wurde eine bislang noch nicht identifizierte Veränderung im *KCND1*-Gen beschrieben.

Schlüsselwörter

Mentale Retardierung, X-gebundene mentale Retardierung, Chromosomenanomalien

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung.....	1
1.1	Mentale Retardierung.....	1
1.1.1	Definition, Klassifikation, Probleme.....	1
1.1.2	Ursachen.....	2
1.1.3	Komorbiditäten.....	3
1.2	Das menschliche Genom.....	4
1.3	Genetische Veränderungen.....	5
1.3.1	Numerische Chromosomenveränderungen.....	5
1.3.2	Strukturelle Chromosomenveränderungen.....	6
1.3.3	Monogene Veränderungen.....	7
1.3.4	Epigenetische Veränderungen.....	9
1.3.5	Nachweis von genetischen Veränderungen bei Individuen mit mentaler Retardierung..	9
1.4	X-gebundene mentale Retardierung.....	11
1.5	Zielsetzung.....	11
2.	Material und Methoden.....	12
2.1	Patienten.....	12
2.2	Datenbank.....	12
2.3	Statistische Verfahren.....	16
2.4	Labormethoden.....	16
2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	16
2.4.2	Gelelektrophorese.....	17
2.4.3	Aufreinigung des PCR-Ansatzes.....	19
2.4.4	DNA-Sequenzierung.....	19
2.4.5	Aufreinigung des Sequenzier-Ansatzes.....	20
2.4.6	Multiplex-PCR.....	21
2.4.7	Long-Range PCR.....	21

2.4.8	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification	22
2.4.9	Next Generation Sequencing.....	24
3.	Ergebnisse.....	25
3.1	Datenbankanalyse.....	25
3.1.1	Soziodemografische Struktur der Kohorte	25
3.1.2	Grad der intellektuellen Beeinträchtigung.....	26
3.1.3	Diagnostikmöglichkeiten, Diagnosequote und -spektrum.....	28
3.1.4	Einflüsse in der Schwangerschaft.....	31
3.1.5	Komorbiditäten.....	32
3.2	Untersuchungsergebnisse bei ausgewählten Patienten.....	35
3.2.1	Familie A.....	35
3.2.2	Familie B	38
3.2.3	Familie C	42
3.2.4	Familie D.....	44
4.	Diskussion	47
4.1	Datenbankanalyse.....	47
4.1.1	Geschlechterverhältnis, Altersverteilung, Grad der MR	47
4.1.2	Diagnostikmöglichkeiten, Diagnosequote und -spektrum.....	48
4.1.3	Einflüsse in der Schwangerschaft.....	49
4.1.4	Komorbiditäten.....	50
4.1.5	Zusammenfassung	53
4.1.6	Limitationen der Datenbankanalyse und Ausblick in die Zukunft.....	53
4.2	<i>BRWD3</i> -Mutationen als Ursache für ein X-gebundenes Syndrom mit Makrozephalie und mentaler Retardierung.....	54
4.3	<i>KCND1</i> als mögliches neues Gen für eine X-gebundene mentale Retardierung	59
4.4	Submikroskopische Kopiezahlvarianten als Ursachen unspezifischer und familiärer mentaler Retardierung.....	60
5.	Zusammenfassung	62

6.	Literaturverzeichnis	63
7.	Abbildungsverzeichnis	72
8.	Tabellenverzeichnis	73
9.	Danksagung	75
10.	Ehrenerklärung	76
11.	Lebenslauf	77
12.	Publikationen.....	78
A)	Anlagen.....	79
A.1	Geräte	79
A.2	Verbrauchsmaterialien.....	81
A.3	Chemikalien.....	82
A.4	Lösungen und Puffer	83
A.5	Erwähnte Gene	84
A.6	Primer	85
A.6.1	<i>BRWD3</i> -Gen	85
A.6.2	<i>KCND1</i> -Gen	85
A.7	MLPA-Sonden.....	86
A.8	Programme	87
A.9	Master-Mixe, Primer-Mix, Probe-Mix, Lade-Mix	89
A.10	Software.....	91
A.11	Erklärung zu Tabelle 4.1	92

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom
Array-CGH	Array-based Comparative Genomic Hybridization
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA
CGS	Contiguous Gene Syndromes
CNV	copy number variants
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalogramm
e.V.	eingetragener Verein
FASD	fetal alcohol spectrum disorders
FFPE-Proben	Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete Proben
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G	Guanin
GTG	G-bands by Trypsin using Giemsa
IQ	Intelligenzquotient
JAK	Januskinase
KI	Konfidenzintervall
Kv	spannungsabhängiger Kaliumkanal
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MR	mentale Retardierung
MRNet	German Mental Retardation Network
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NGS	Next Generation Sequencing
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man

ORF	Open reading frame
OVGU	Otto-von-Guericke-Universität
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
QOF	Quality and Outcomes Framework
qPCR	Real Time quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
snRNP	small nuclear Ribonucleoprotein Particle
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SV	structural variants
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA
U	Uracil
UV	ultraviolett
XCI	X-chromosomale Inaktivierung
XLMR	X-gebundene mentale Retardierung

1. Einführung

1.1 Mentale Retardierung

1.1.1 Definition, Klassifikation, Probleme

Unter mentaler Retardierung (MR) wird eine verzögerte oder unvollständige Entwicklung der geistigen Fähigkeiten verstanden. Sie führt in der Regel zu einer bleibenden Intelligenzminderung. Dabei sind insbesondere Fertigkeiten, die zum Intelligenzniveau beitragen, wie zum Beispiel Kognition, Sprache, motorische und soziale Fähigkeiten, beeinträchtigt. Eine Intelligenzminderung kann allein oder zusammen mit einer anderen psychischen oder körperlichen Störung auftreten (World Health Organization 2012). Sie beginnt vor dem 18. Lebensjahr (Chelly et al. 2006) und wird meist im Vorschul-/Schulalter erkannt (Battaglia und Carey 2003). Für die Häufigkeit in der Gesamtbevölkerung sind unterschiedliche Werte bekannt. Sie reichen von 1% bis 10% (Battaglia und Carey 2003, Chelly et al. 2006, Ropers 2010) und erklären sich vor allem durch die uneinheitliche Definition des Begriffes der MR (Leonard und Wen 2002). In Entwicklungsländern wird die Prävalenz der Intelligenzminderung höher als in den entwickelten Ländern geschätzt, wofür verschiedene Faktoren wie elterliche Konsanguinität, Mangelernährung und schlechtere medizinische Versorgung in Frage kommen (Ropers 2010). Insgesamt ist die Manifestation im männlichen Geschlecht signifikant höher als im weiblichen (1,5:1) (Battaglia und Carey 2003). Anhand des Intelligenzquotienten (IQ) werden vier verschiedene Kategorien der MR, von leicht bis sehr schwer, unterschieden (siehe Tabelle 1.1) (World Health Organization 2012). Dabei kommen leichte Formen häufiger (Prävalenz 1-3%) als moderate und schwere (Prävalenz 0,3-0,5%) vor (Chelly et al. 2006). In einigen epidemiologischen Studien wird aus Gründen der Vereinfachung nur in zwei Kategorien, leicht (IQ>50) und schwer (IQ<50), gruppiert (Ropers und Hamel 2005).

Tabelle 1.1 Einteilung der MR anhand des Intelligenzquotienten (World Health Organization 2012)

Schweregrad	Intelligenzquotient
leicht	50-69
moderat	35-49
schwer	20-34
sehr schwer	<20

Ein weiteres Unterscheidungskriterium ist die Unterteilung in syndromale und nicht-syndromale MR (Whibley et al. 2010). Zusätzlich zu der bei den nicht-syndromalen Formen allein vorkommenden MR, sind die syndromalen Formen durch das Auftreten von assoziierten physischen, neurologischen und/oder metabolischen Veränderungen gekennzeichnet (Lubs et al. 2012). Die Identifikation einer syndromalen MR kann einfacher sein als die der nicht-syndromalen, da hierbei ein konkreter klinischer Verdacht gezielt genetisch abgeklärt werden kann. Jedoch können durch mild ausgeprägte

Phänotypen und eine unvollständige Penetranz bestimmter Merkmale syndromale Formen übersehen werden (Piton et al. 2013). Die ursprüngliche Annahme bestand darin, dass beide Retardierungsformen eine unterschiedliche genetische Basis besitzen (Renieri et al. 2005). Da bereits einige Gene bekannt wurden, die sowohl mit syndromaler als auch mit nicht-syndromaler Form der MR assoziiert sind, wird diese Unterteilung weniger strikt verwendet und dient heute hauptsächlich dazu, eine erste phänotypische Klassifizierung durchzuführen (Renieri et al. 2005). In den westlichen Ländern ist die geistige Behinderung für 5-10% der Kosten des Gesundheitssystems verantwortlich (Tarpey et al. 2009). Neben diesem finanziellen Aspekt belastet die zum Teil lebenslang benötigte Unterstützung die betroffenen Familien. Eltern wünschen die Ursache für die Intelligenzminderung zu erfahren, um die Entwicklungsprognose ihres Kindes abschätzen und Informationen über ein eventuelles Wiederholungsrisiko erhalten zu können. Diesem Bedarf soll durch standardisierte Untersuchungskonzepte von intelligenzgeminderten Kindern nachgegangen werden (Curry et al. 1997). Auf diese wird im Folgenden näher eingegangen. Bei der Erstuntersuchung sollen die Geburtsanamnese, ein Drei-Generationen-Stammbaum, die Wachstumsmaße sowie physische und neurologische sowie Verhaltensauffälligkeiten betrachtet werden. Weiterhin sollen bei der klinischen Untersuchung jegliche Veränderungen dokumentiert werden. Für ungelöste Fälle ist die wiederholte Untersuchung der Betroffenen in einem gewissen zeitlichen Abstand empfehlenswert, da sich im Verlauf neue Aspekte ergeben und sich die Merkmale eines klinisch erkennbaren Krankheitsbildes auch erst mit dem Alter konkretisieren können. Als Standarduntersuchung sollte von jedem Patienten ein Karyogramm erstellt und eine molekulargenetische Diagnostik bezüglich eines Fragilen-X-Syndroms durchgeführt werden. Metabolische Tests, FISH- (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) und Mikroarray-Analysen sowie andere molekulargenetische Untersuchungen sollen ausschließlich bei Patienten mit konkretem Verdacht durchgeführt werden. Es besteht die Hoffnung, dass durch eine zeitnahe Diagnose eine frühere Förderung Betroffener begonnen werden kann und dadurch der Therapieerfolg verbessert wird (Shevell et al. 2003). Weiterhin soll durch genaue Ursachenklärung ein Einblick in die Physiologie und Pathophysiologie der Hirnentwicklung ermöglicht werden (Whibley et al. 2010). Unter dem Suchbegriff „mental retardation“ findet man in der OMIM-Datenbank (Online Mendelian Inheritance in Man, siehe Tabelle A.27) 3.306 Einträge (Stand 09.07.2017), verglichen mit 1.220 Einträgen am 02.09.2004 (Renieri et al. 2005). Dies weist auf die enorme Bedeutung dieses Krankheitsbildes hin und deutet den Fortschritt in der Ursachenforschung der vergangenen Jahre an.

1.1.2 Ursachen

Obwohl die Diagnose MR häufig gestellt wird, ist über die Ursachen immer noch wenig bekannt. So bleiben 30-50% der Fälle ungeklärt (Armatas 2009). Als exogene Risikofaktoren sind ein niedriges Geburtsgewicht, Alkohol-, Tabak-, Drogen- oder Medikamentenkonsum der Mutter während der Schwangerschaft sowie Frühgeburtlichkeit bekannt (Leonard und Wen 2002, Huang et al. 2016). Des

Weiteren müssen prä-, peri-, oder postnatale Probleme in Betracht gezogen werden, wozu vor allem Infektionen und Traumata zählen (Armatas 2009). Rauchen in der Schwangerschaft kann zu einem erniedrigten Geburtsgewicht führen (Zarén et al. 2000). Eine prä- und/oder postnatale Wachstumsretardierung (Länge, Gewicht, Kopfumfang) ist ebenfalls für die „fetal alcohol spectrum disorders“ (FASD) beschrieben. Eine der ersten Erwähnungen eines Krankheitsbildes basierend auf Alkoholkonsum in der Schwangerschaft stammt aus dem Jahr 1973 (Jones et al. 1973). Zu den durch Alkohol entstehenden Veränderungen gehören Störungen des zentralen Nervensystems (Rosett 1980), Verhaltensauffälligkeiten (Green et al. 2014) und Herzfehler (Sun et al. 2015). Weiterhin werden faziale Auffälligkeiten wie eine schmale Oberlippe, ein verstrichenes Philtrum (Rosett 1980), eine Ptosis und ein Epikanthus beschrieben (Flanigan et al. 2008). Zu den Effekten auf Hirnfunktionen werden ein reduzierter IQ und Störungen der Aufmerksamkeit, der Reaktionszeit, der Grob- und Feinmotorik, der Sprache, des Gedächtnisses, der sozialen Kompetenzen und der Anpassungsfähigkeit gezählt (Riley und McGee 2005). Die Prävalenz reicht von 0,2-8,2 pro tausend Geburten (Landgraf et al. 2013). Insgesamt sind Teratogene, Umwelteinflüsse und Frühgeburtlichkeit aber nur für schätzungsweise 7-23% der Fälle von MR ursächlich (Curry et al. 1997). In den Industrienationen konnten Maßnahmen etabliert werden, die der Entstehung einer kindlichen Schädigung mit den potenziellen Folgen einer MR vorbeugen. Dazu gehören unter anderem die Impfung der Mutter zur Vermeidung der Rötelnembryopathie, die Einnahme von Folsäure während der Schwangerschaft zur Prävention von Neuralrohrdefekten und eine verbesserte Schwangerschaftskontrolle und Geburtshilfe (Ropers 2010). Mit der Aufnahme des erweiterten Neugeborenencreenings in den Leistungskatalog der gesetzlichen Krankenkassen im Jahre 2005 (Deutsche Gesellschaft für Neugeborenencreening e.V. [eingetragener Verein] 2005), ist es deutschlandweit möglich, angeborene Stoffwechseldefekte frühzeitig zu erkennen und zu behandeln (Phenylketonurie, Hypothyreose). Diese metabolischen Ursachen sind schätzungsweise für 1-5% der Fälle von MR verantwortlich. Hauptursache für eine MR sind hingegen genetische Veränderungen, wobei Chromosomenanomalien in 4-28%, monogene Erkrankungen in 4-14% und syndromale Erkrankungen in 3-7% der Fälle verantwortlich sind (Curry et al. 1997). Bislang sind über 500 verursachende Gene bekannt (Kleefstra et al. 2014).

1.1.3 Komorbiditäten

Es existieren bestimmte Erkrankungen, die, verglichen mit der Normalbevölkerung, gehäuft bei Personen mit intellektueller Beeinträchtigung vorkommen. Dazu gehören insbesondere Verhaltensauffälligkeiten, psychiatrische Krankheitsbilder (Depression, Bipolare Störungen, Schizophrenie), Veränderungen in der Schädelform und Epilepsie (Carvill und Mefford 2015, Munir 2016, van Ool et al. 2016). Das Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHS) tritt bei Jungen häufiger auf als bei Mädchen (Kelleher et al. 2000). Diese Verhaltensauffälligkeit betrifft etwa 5% aller Kinder und Erwachsenen (Polanczyk et al. 2007). Dagegen wird die Prävalenz bei Personen

mit leichter MR mit 8-39% angegeben (Ahuja et al. 2013). Das Syndrom ist durch ein hohes Maß an Unaufmerksamkeit, Impulsivität und Hyperaktivität gekennzeichnet (Hiscock et al. 2015). Der Mikrozephalus ist einer der häufigsten Schädelveränderungen bei Patienten mit MR. Er ist über einen Kopfumfang kleiner als -2 Standardabweichungen (SD) des Mittelwertes der jeweiligen Alters- und Geschlechtsgruppe definiert (Opitz und Holt 1990). In einer normalverteilten Population kommt ein schwerer Mikrozephalus ($< -3SD$) bei 0,1% der Kinder vor. Neben genetischen Ursachen, die bei 15,5-53,3% der Betroffenen gefunden werden können, gibt es für die Entwicklung eines Mikrozephalus viele ursächliche Umweltfaktoren, wie beispielsweise Infektionen, Traumen, Zigaretten- und Alkoholkonsum (Ashwal et al. 2009). Als Makrozephalus wird eine Erhöhung des Kopfumfangs über +2 SD des Mittelwertes der jeweiligen Alters- und Geschlechtsgruppe bezeichnet (Biran-Gol et al. 2010). Meist resultiert er aus einem Hydrozephalus oder aus einer Erhöhung der Gehirnmasse (Megalenzephalie) (Lorber und Priestley 1981). Die Häufigkeit des Merkmals Makrozephalie ist erhöht in Kohorten mit MR oder Autismus (Miles et al. 2000, Curry et al. 1997).

1.2 Das menschliche Genom

Der Mensch besitzt einen diploiden Chromosomensatz, bestehend aus 23 homologen Chromosomenpaaren. Die Mitose dient der Entstehung zweier zur Mutterzelle identischer Tochterzellen. Dagegen wird bei der Meiose in zwei aufeinanderfolgenden Reifeteilungen aus dem diploiden Chromosomensatz ein haploider. Dies führt zur artspezifisch gleichbleibenden Anzahl der Chromosomen während der Fortpflanzung. Molekular sind die Chromosomen eine hochkomplexe Struktur aus Desoxyribonukleinsäure (DNA) und regelmäßig angeordneten Proteinmolekülen (Histonen). Die DNA liegt als strickleiterartiger Doppelstrang aus zwei fadenförmigen langen Molekülen vor, die um eine gemeinsame Längsachse geschraubt sind (Doppelhelix). Als Grundeinheit enthält sie Nukleotide, die aus einem Zucker- (Desoxyribose) und einem Phosphatrest sowie einer der vier Basen Guanin (G), Adenin (A), Thymin (T) und Cytosin (C) bestehen. Die Basen bilden durch komplementäre Paarung die „Querstreben“ der Strickleiter, wobei sich nur Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin miteinander paaren können, sodass die Basenabfolge des einen Stranges die des anderen Stranges bestimmt. Nur etwa 3% der gesamten menschlichen DNA beherbergt die eigentlichen proteinkodierenden Gene, also bestimmte Einheiten des Erbguts, die zusammen die Information für ein Polypeptid beinhalten. Sie umfassen meist Exons und Introns. Während der Transkription wird von den Genen, gesteuert durch sogenannte Promotorregionen von der Transkriptionsmaschinerie der Zelle, eine komplementäre einzelsträngige Ribonukleinsäure- (RNA-) Kopie angefertigt. Im Anschluss werden Introns entfernt (Spleißen) und andere Modifikationen an dem RNA-Molekül vorgenommen, wodurch die reife mRNA (messenger-RNA) entsteht. Diese dient im Translationsprozess als Vorlage für die Proteinsynthese. Drei aufeinanderfolgende Basen (Basentriplett, Codon) kodieren für eine der 20 existierenden Aminosäuren. Der Tripletcode eines

Gen wird in die spezifische Aminosäurefolge des Genprodukts (Protein) übersetzt, wobei durch alternatives Spleißen der RNA ein Gen für mehrere Proteine kodieren kann. Jedes autosomale Gen existiert in zwei Kopien, den Allelen, welche auf gleichen Genorten der homologen Chromosomen liegen. Die Gesamtheit des genetischen Materials wird als Genom, die genetisch kodierte Information eines Individuums als Genotyp bezeichnet. Aus einem bestimmten Genotyp entsteht das Erscheinungsbild (Phänotyp), wodurch Veränderungen im Genotyp eine Änderung des Phänotyps zur Folge haben können. Die Höhe dieser Wahrscheinlichkeit wird als Penetranz angegeben (vollständig oder unvollständig) (Mahdih und Rabbani 2013).

1.3 Genetische Veränderungen

Mutationen sind dauerhafte Veränderungen der Erbsubstanz. Sie entstehen entweder spontan, ohne äußerliche Einwirkung oder werden ungezielt unter anderem durch chemische und physikalische Einflüsse (Mutagene) erzeugt. Sie können die Körperzellen betreffen (somatische Mutationen) und werden in diesem Fall nur innerhalb des Organismus weitergegeben oder sie kommen in den Geschlechtszellen vor (Keimbahnmutationen) und können an die Nachkommen vererbt werden (Poduri et al. 2013). Anhand der Menge des betroffenen genetischen Materials können die genetischen Veränderungen in Chromosomenaberrationen (numerisch und strukturell) und Genmutationen unterteilt werden.

1.3.1 Numerische Chromosomenveränderungen

Numerische Chromosomenveränderungen sind durch Veränderungen der Chromosomenanzahl gekennzeichnet, welche durch Störungen bei der Verteilung der Chromosomen während der Kernteilung (Nondisjunktion, siehe Abbildung 1.1) entstehen. Dabei können entweder der gesamte Chromosomensatz (Polyploidie) oder nur einzelne Chromosomen (Aneuploidie) von der Abweichung betroffen sein. Die häufigste mit MR assoziierte Aneuploidie ist die Trisomie 21 mit einer Inzidenz von 1:750-1:1.000 (Karmiloff-Smith et al. 2016). Weitere überlebensfähige Veränderungen sind die Trisomie 18 und 13 und die Monosomie X (Ulrich-Turner-Syndrom). Viele numerische Chromosomenaberrationen nehmen mit dem Alter der Mutter aufgrund der häufigeren Fehler während der Reifeteilung zu (Mahdih und Rabbani 2013, Donnelly und Storchová 2014).

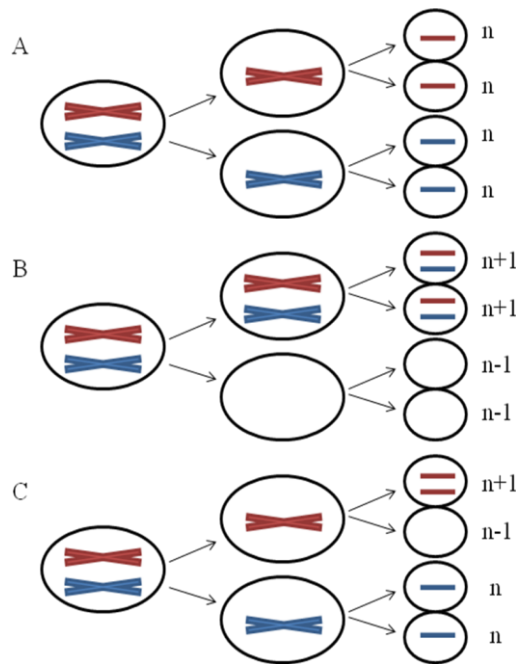


Abbildung 1.1 Numerische Chromosomenaberrationen, modifiziert nach (Dorland's Medical Dictionary for Health Consumers 2007)

A stellt eine normale Meiose dar, **B** einen Verteilungsfehler während der ersten Reifeteilung, aus dem nach Verschmelzung mit einer euploiden Keimzelle ausschließlich Aneuploidien (Monosomien /Trisomien im Verhältnis 1:1) resultieren, **C** einen Fehler während der zweiten Reifeteilung, bei dem bei der Hälfte der hervorgehenden Keimzellen eine Aneuploidie auftritt.

1.3.2 Strukturelle Chromosomenveränderungen

Bei strukturellen Chromosomenaberrationen ist die Chromosomenanzahl normal, die Struktur einzelner Chromosomen aber mikroskopisch sichtbar verändert. Einige Beispiele stellt die Abbildung 1.2 schematisch dar. Es können Anteile des Chromosoms verloren gehen (Deletion) oder verdoppelt werden (Duplikation). Bei der Drehung von Chromosomenabschnitten (Inversion) bleibt zwar die Menge genetischen Materials erhalten, jedoch wird deren Reihenfolge geändert, was an den Bruchpunkten zu phänotypisch relevanten Auswirkungen auf die dort lokalisierten Gene führen kann. Von Translokationen oder Insertionen spricht man, wenn ein Chromosomenabschnitt auf ein nichthomologes Chromosom verlagert wird. Diese Veränderungen können entweder balanciert oder unbalanciert sein, je nachdem ob beide involvierten Chromosomen in der Zelle vorhanden sind oder nicht. Balancierte Veränderungen können durch die Beeinträchtigung einzelner Gene in den Bruchpunktbereichen phänotypisch relevant sein. Die meisten Träger von Inversionen sowie balancierten Translokationen oder Insertionen sind aber phänotypisch unauffällig. Weitere strukturelle Chromosomenveränderungen sind Ringchromosomen, bei denen die Enden des Chromosoms fusionieren und Isochromosomen, die durch Verlust eines Chromosomenarmes (p oder q) und spiegelbildliche Verdopplung des anderen (komplett oder partiell) entstehen (Biesecker und Spinner 2013). Ein Beispiel für strukturelle Chromosomenveränderungen im Zusammenhang mit MR ist das Cri-du-chat-Syndrom (partielle Monosomie des kurzen Arms des Chromosoms 5) (Mahdiah und Rabbani 2013).

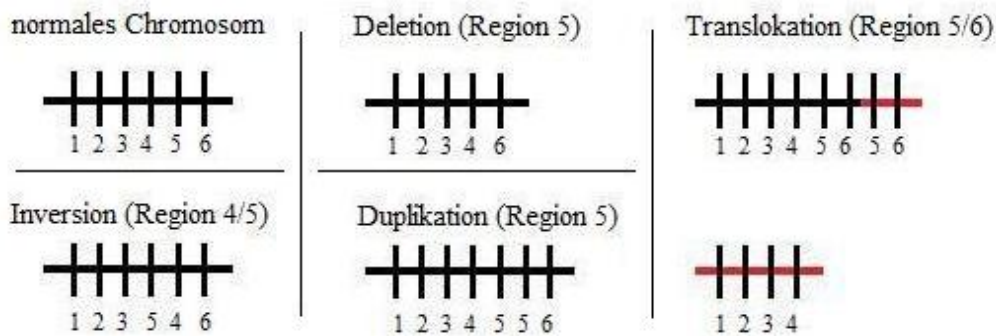


Abbildung 1.2 Strukturelle Chromosomenaberrationen, modifiziert nach (Wikipedia 2017)

Die Abbildung stellt schematisch strukturelle Chromosomenveränderungen dar. Das normale Chromosom besteht in dieser Abbildung aus 6 Regionen, welche in den einzelnen Beispielen von unterschiedlichen Veränderungen betroffen sind. Inversion bedeutet die Drehung (hier der Regionen 4 und 5), Deletion Verlust (hier von Region 5), Duplikation Verdopplung (hier von Region 5) und Translokation die Verschiebung auf ein nichthomologes Chromosom (hier die Regionen 5 und 6).

Kopienzahlveränderungen (Gewinn oder Verlust) von subchromosomalen Regionen, die mittels mikroskopischer Chromosomenanalyse nicht erkannt werden können, werden als Mikrodeletionen oder Mikroduplikationen bezeichnet. Die resultierenden Phänotypen gelten vielfach als „Contiguous Gene Syndromes (CGS)“. Der Begriff CGS impliziert, dass der Verlust/Zugewinn mehrerer nahe beieinander liegender Gene in der Deletions-/Duplikationsregion für den Phänotyp verantwortlich sind. Mittlerweile wurde bei einigen dieser Syndrome erkannt, dass zwar mehrere Gene von der Kopienzahlveränderung betroffen sind, jedoch nur eines einen Dosiseffekt hat und somit für die wesentliche Ausprägung des Phänotyps verantwortlich ist. Aus diesem Grund werden heute die Begriffe Mikrodeletions- und Mikroduplikationssyndrome bevorzugt (Weise et al. 2012). Das DiGeorge-Syndrom (Deletion 22q11.2) ist mit einer Häufigkeit von 1:4.000 das häufigste mit MR assoziierte Mikrodeletionssyndrom (Burnside 2015).

1.3.3 Monogene Veränderungen

Genmutationen sind im Vergleich zu den Chromosomenstörungen kleine Veränderungen, die nur den Bereich der DNA umfassen, der für ein einzelnes funktionelles Produkt kodiert. Sie sind mikroskopisch nicht sichtbar. Bei den Punktmutationen sind eine Base und ihr komplementärer Partner des anderen Stranges betroffen. Hierbei können entweder stumme, Missense- oder Nonsense-Mutationen resultieren. Bei der stummen Mutation kodiert die veränderte genetische Sequenz trotz ausgetauschter Base für die gleiche Aminosäure, sodass phänotypisch in der Regel keine Auswirkungen zu erwarten sind. Bei der Missense-Mutation wird eine andere Aminosäure in das Protein eingebaut, sodass ein verändertes Genprodukt die Folge ist. Die funktionellen und phänotypischen Konsequenzen sind jedoch nicht immer klar vorherzusagen. Nonsense-Mutationen führen zur Entstehung eines Stopp-Codons. Die Folge sind entweder ein rascher Abbau der mRNA (nonsense-mediated decay) oder ein verfrühter Abbruch der Translation und damit ein verkürztes Genprodukt. Da immer drei Basen für eine Aminosäure kodieren, kommt es durch das Einfügen

(Insertion) oder den Verlust (Deletion) eines Basen- bzw. eines Nukleotidpaares zu einer Leserasterverschiebung (Frameshift-Mutation), die ebenfalls oft in der mRNA zu einem vorzeitigen Stopp-Codon führt. Für Nonsense- und Frameshift-Mutationen lässt sich somit meist eine schädigende Wirkung auf das Genprodukt klar vorhersagen. Eine schematische Übersicht über die beschriebenen Genmutationen zeigt Abbildung 1.3 (Mahdih und Rabbani 2013, Keeling und Bedwell 2011).

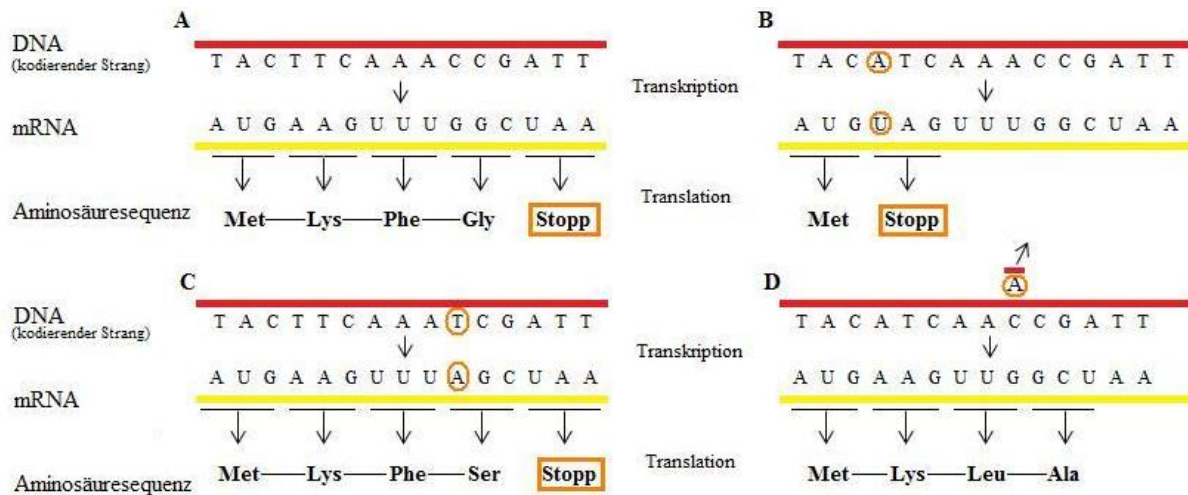


Abbildung 1.3 Genmutationen, modifiziert nach (Pearson Education 2010)

Die Abbildung stellt verschiedene Genmutationen schematisch dar. Die roten Kreise deuten den jeweiligen Defekt an. **A** zeigt den normalen Transkriptions- und Translationsvorgang, **B** eine Nonsense-Mutation, bei der frühzeitig ein Stopp-Codon entsteht, **C** eine Missense-Mutation, bei der ein verändertes Produkt entsteht und **D** eine Frameshift-Mutation, bei der das Leseraster verschoben wird.

Entspricht die Anzahl der fehlenden bzw. hinzugefügten Basenpaare einem Vielfachen der Zahl drei, kommt es zu keiner Leserasterverschiebung. Man spricht von In-frame-Deletionen/-Duplikationen. Weiterhin können Inversionen auftreten. Bei den Substitutionen wird eine Base gegen eine andere ausgetauscht. Veränderungen in intronischen Abschnitten, vor allem in den unmittelbar vor und nach einem Exon gelegenen Sequenzen, können das Spleißen der RNA beeinträchtigen (sogenannte Spleiß-Mutationen) und dadurch unterschiedliche Auswirkungen auf die mRNA und das resultierende Protein haben (Mahdih und Rabbani 2013, Keeling und Bedwell 2011). Das menschliche Genom besteht zu 10% aus repetitiven Sequenzen, die bei der Vererbung von einer Generation zur nächsten verändert, meist verlängert, werden können. An wenigen Stellen können Veränderungen in der Repeat-Zahl solcher repetitiven Sequenzen krankheitsverursachend wirken (dynamische Mutation). Pathogen wirkt die Expansion von Wiederholungseinheiten (häufig Triplets) über eine kritische Grenze. Der Schweregrad der Erkrankung oder das Alter bei der Manifestation kann mit der Repeatlänge korrelieren. Wenn diese Länge von Generation zu Generation zunimmt und sich die Erkrankung in einer nachfolgenden Generation früher manifestiert spricht man von Antizipation. Die häufigste dynamische Mutation, die im Zusammenhang mit MR steht (1-2% aller Fälle) (Piton et al. 2013), ist das Fragile-X-Syndrom (Inzidenz der Frauen mit Prämutation 1:130-250, der Männer mit Prämutation 1:250-810, der betroffenen Männer 1:4.000-7.000) (Lozano et al. 2014).

1.3.4 Epigenetische Veränderungen

Epigenetik ist ein Prozess bei dem die Genexpression durch DNA-Methylierung oder Modifikation von Histonen verändert wird, ohne dass die Nukleotidsequenz selbst eine Änderung erfährt (Triantaphyllopoulos et al. 2016). Beim genomischen Imprinting hängt die Expression bestimmter Gene von der elterlichen Herkunft ab. Die Steuerung erfolgt durch ein Imprinting-Center. Das Allel des einen Elternteils wird durch Methylierung inaktiviert, das Allel des anderen Elternteils bleibt unmethyliert und damit aktiv. Es resultiert eine monoallelische Genexpression (Bajrami und Spiroski 2016). Durch Veränderungen in der Imprint-Region, welche das Methylierungsmuster in dieser Region beeinflussen, können Erkrankungen entstehen. Der größte Teil dieser Erkrankungen beruht auf strukturellen Veränderungen (insbesondere Deletionen) eines Allels. Eine weitere mögliche Ursache von Veränderungen ist das Vorhandensein zweier Allele desselben Elternteils (uniparentale Disomie). Ein geringer Anteil entsteht durch Defekte im Imprinting-Center (Imprintingdefekt) (Cheon 2016). Zu den mit MR assoziierten Erkrankungen, die auf epigenetische Veränderungen beruhen, gehören unter anderem das Prader-Willi-Syndrom, das Angelman-Syndrom, das Silver-Russell-Syndrom und das Beckwith-Wiedemann-Syndrom.

1.3.5 Nachweis von genetischen Veränderungen bei Individuen mit mentaler Retardierung

Durch mikroskopische Chromosomenanalyse (Karyotypisierung), also einer geordneten Darstellung aller Chromosomen eines Menschen, werden vor allem numerische Chromosomenanomalien und große strukturelle Veränderungen (structural variants, SV) identifiziert. Die Auflösungsgrenze liegt hierbei bei 5.000 kb (Shaw-Smith et al. 2004). Von allen Fällen der MR können etwa 9,5% mithilfe dieser Untersuchungsmethode identifiziert werden (Afroze und Chaudhry 2013). Sie galt lange Jahre (seit Anfang der 1970er Jahre) als Standard der genetischen Diagnostik bei MR und wird auch heute noch genutzt. Sie eignet sich nicht zur Detektion kleinerer Veränderungen (Le Scouarnec und Gribble 2012). Hierfür finden andere Untersuchungsmethoden Anwendung. Anfang der 1990er Jahre wurde die FISH zur Diagnostik kleiner struktureller Chromosomenanomalien (copy number variants, CNV) wie submikroskopische Deletionen und Translokationen eingesetzt. Hierbei binden mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Sonden komplementär an die Ziel-DNA. Zur Darstellung kommen die Ergebnisse mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Voraussetzung ist die vorherige Vermutung über die Lage der Veränderung, um eine geeignete Sonde zu nutzen (Le Scouarnec und Gribble 2012). Die systematische FISH-Untersuchung der Subtelomerregionen aller Autosomen hat einen diagnostischen Gewinn für 4,4% anderweitig nicht zu klärender Fälle von MR erbracht (Afroze und Chaudhry 2013). Ebenfalls zu den gezielten Untersuchungen gehören die Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA, siehe Kapitel 2.4.8) und die real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR), die beide dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, siehe Kapitel 2.4.1) folgen und

einen Nachweis von Kopienzahlveränderungen für die mit den entsprechenden Oligonukleotid-Sonden/-Primern adressierten genomischen Abschnitten ermöglichen (Le Scouarnec und Gribble 2012). Die genannten Untersuchungsmethoden können unter dem Schlagwort „phenotype-first“ zusammengefasst werden, da sie alle eine gezielte Untersuchung bei einer konkreten Verdachtsdiagnose ermöglichen. Im klinischen Alltag ist es jedoch wichtig, Möglichkeiten der Diagnostik ohne diesen konkreten Verdacht zu besitzen („genotype-first“) (Kloosterman und Hochstenbach 2014). Eine ungezielte Analyse aller Chromosomen auf kleine Kopienzahlveränderungen (CNV) ist seit der Einführung der DNA-Chip-Technologie (DNA-Mikroarray) möglich. Sie gilt mittlerweile - seit Mitte der 2000er Jahre - als Routinediagnostik bei Fällen mit anderweitig ungeklärter MR. Der Chip (Mikroarray) besteht aus einem Glas- oder Kunststoffträger, der in mehrere tausend bis über eine Million Felder eingeteilt ist. Auf jedes dieser Felder von wenigen μm Größe ist eine für einen bestimmten Genlocus spezifische Sonde mit definierter Nukleinsäuresequenz aufgebracht. An diese Sonden kann die zu analysierende mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Proben-DNA komplementär binden (hybridisieren). Die Detektion des Fluoreszenzsignals, welches von der Menge/dem Mengenverhältnis der gebundenen Proben-DNA abhängt, erfolgt über eine hochauflösende Laserkamera. Der Vorteil dieser Methode ist die hohe Sensitivität und Spezifität und die Möglichkeit mehrere tausend Regionen gleichzeitig zu untersuchen (Nazar et al. 2010, Le Scouarnec und Gribble 2012). Viele CNV, die mit der Methode entdeckt werden können, sind jedoch nicht krankheitsverursachend, sondern stellen benigne Kopienzahlpolymorphismen dar. Deshalb sollte vor allem bei fraglichen Ergebnissen, eine gezielte Untersuchung des genetischen Materials beider Eltern erfolgen (Flore und Milunsky 2012). Die Auflösung moderner Arrays geht hinunter bis auf die Größe einzelner Gene (10-50 kb), sodass gelegentlich auch monogene Erkrankungen (z.B. durch größere intragenetische Deletionen) mit der Methode nachgewiesen werden können. Es sind aber immer nur Kopienzahlveränderungen, die mit dem Array erfasst werden. Zum Nachweis von Punktmutationen und kleinen intragenischen Veränderungen ist die Sequenzierungsmethode nach Sanger von entscheidender Bedeutung, die vor allem nach der technischen Entwicklung der Kapillar-Sequencer ab den 1990er Jahren zunehmend breiten Eingang in die Gendiagnostik gefunden hat. Die konventionelle Sequenzierung basiert auf der Amplifikation bestimmter Zielsequenzen mittels spezifischer PCR. Daher handelt es sich auch hier um eine gezielte Methode, die nur für die Analyse einzelner Kandidatengene bei einer konkreten Verdachtsdiagnose in Frage kommt. Große Abschnitte des menschlichen Genoms innerhalb weniger Tage zu untersuchen bietet die Next Generation Sequencing - Technologie (NGS), wobei entweder eine größere Anzahl von Genen (Multigen-Panels), die Gesamtheit aller Exons (whole exome sequencing) oder das gesamte Genom (whole genome sequencing) untersucht werden können. Diese Methoden stehen an der Schwelle einer Einführung in die klinische Routine und stellen vor allem für Erkrankungen mit großer genetischer Heterogenität und geringer klinischer Spezifität - wie es auch

und vor allem für viele Fälle mit MR gilt – eine wesentliche neue Entdeckung dar. Das größte Problem der NGS-Technologie ist die große Datenmenge mit dem Nachweis mehrerer nicht eindeutig klassifizierbarer Genveränderungen, die die Datenanalyse vor eine große Herausforderung stellt (Abel und Duncavage 2013, Watson et al. 2014).

1.4 X-gebundene mentale Retardierung

Ein genetischer Subtyp der MR ist die X-gebundene MR (XLMR). Sie wird durch zahlreiche verschiedene sich auf dem X-Chromosom befindende Gendefekte verursacht und kommt im männlichen Geschlecht mit einer Häufigkeit von 1:600 bis 1:1.000 vor. Zur Synthese der gleichen Produktmenge von X-gebundenen Genen ist bei beiden Geschlechtern durch die Heterochromatisierung eines X-Chromosoms im weiblichen Geschlecht nur ein X-Chromosom transkriptionell aktiv (X-Inaktivierung (XCI, X-chromosomal inactivation)) (Shevchenko et al. 2013). Insgesamt werden etwa 4% des menschlichen Genoms durch die XCI epigenetisch reguliert (Wu et al. 2014). Bei der XLMR wird in der Regel das defekte X-Chromosom bei weiblichen Individuen inaktiviert, wodurch die Ausprägung des Phänotyps verhindert werden kann. Weibliche Organismen können die Erkrankung jedoch an männliche Nachkommen vererben – sie sind Konduktorinnen. Als Gesamtheit sind die verschiedenen Formen der XLMR wesentlich für den Überschuss von männlichen Betroffenen unter Individuen mit MR verantwortlich. Aufgrund der relativen Häufigkeit, der Identifizierung vieler Familien mit X-gebundenem Erbgang anhand von auffälligen Stammbäumen (typisches Muster einer X-gebundenen rezessiven Vererbung) und der relativ einfachen Untersuchbarkeit des X-Chromosoms, hatte die Erforschung genetischer Ursachen für MR auf dem X-Chromosom einen deutlichen Vorsprung gegenüber autosomalen Genen (Gécz et al. 2009). Obwohl das X-Chromosom nur 5% des menschlichen Genoms trägt (Brown und Robinson 2000), besagen frühere Schätzungen, dass 20-25% aller Retardierungsfälle auf eine X-gebundene Vererbung entfallen (Turner 1996). Aktuell wird noch von 10-15% aller Fälle ausgegangen (Ropers 2008).

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die retrospektive Erfassung des klinischen Spektrums und der Diagnoserate bei Patienten mit MR des Institutes für Humangenetik der Otto-von-Guericke-Universität (OVGU) Magdeburg über den Zeitraum der Jahre 2000 bis 2012. Hierbei standen die klinischen Daten von 588 betroffenen Patienten zur Verfügung. Mithilfe einer Datenbank wurden diese Daten systematisiert und anschließend unter verschiedenen Gesichtspunkten (Alter- und Geschlechterverteilung, Grad der intellektuellen Beeinträchtigung, Diagnosequote und -spektrum, Einflüsse in der Schwangerschaft und Komorbiditäten der MR) ausgewertet. Aus dem Kollektiv der genetisch ungeklärten Fälle wurden vier Familien mit mehreren betroffenen Personen ausgewählt und im Rahmen dieser Arbeit mithilfe neuer molekulargenetischer Methoden untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

Im humangenetischen Institut der OVGU Magdeburg werden alle bei der genetischen Beratung vorgestellten Patienten in ein internes Patientenverwaltungssystem aufgenommen. Mithilfe dieses Systems konnten die für die Datenerhebung relevanten Fälle von Januar 2000 bis Dezember 2012 anhand der Indikation für die Vorstellungen mit den Schlüsselbegriffen „Entwicklungsverzögerung“, „mentale Retardierung“ und „geistige Behinderung“ gefiltert werden. Bis auf Personen mit Kinderwunsch und Fällen von MR innerhalb der Familie, die sich zur Abschätzung eines möglichen Wiederholungsrisikos vorstellten, selbst aber gesund waren, wurden alle Fälle (insgesamt 588) mit in die Datenerhebung einbezogen. Im Rahmen der genetischen Beratung haben alle Patienten bzw. ihre gesetzlichen Vertreter einer wissenschaftlichen Analyse der Daten zugestimmt. Bei den Patienten, die durch die Datenerhebung als interessant für weitere genetische Untersuchungen identifiziert wurden, erfolgten nach Kontaktaufnahme, Aufklärung und schriftlicher Einwilligung gemäß Gendiagnostikgesetz inklusive einer erweiterten Einverständniserklärung für wissenschaftliche Betrachtungen die weitergehenden Analysen.

2.2 Datenbank

Zur Datenerhebung diente eine Access-basierte passwortgeschützte Datenbank. Klinische Datensätze von Patienten wurden pseudonymisiert in die Datenbank eingetragen und auf dem datengeschützten Server der OVGU Magdeburg gespeichert. Die Datenbank wurde von Dipl. Biol. Andreas Welsch aus Erlangen entwickelt, um das Patientenkollektiv des German Mental Retardation Network (MRNet) zu erfassen. Hierbei handelt es sich um Patienten, die im Rahmen des 2008 gegründeten German MRNet-Projekts humangenetisch untersucht wurden. Dieses Projekt verfolgt das Ziel durch multizentrische Zusammenarbeit (Erlangen, Berlin, Tübingen, München, Bonn, Münster, Dresden, Essen, Heidelberg) Gene für MR systematisch zu identifizieren sowie die Funktion der dadurch kodierten Proteine zu untersuchen (German Mental Retardation Network 2010). Die Software für die Datenbank wurde vom Institut für Humangenetik in Erlangen für dieses Projekt kostenlos zur Verfügung gestellt. Die Eingabemöglichkeiten zur phänotypischen Erfassung der einzelnen Patienten wurde angelehnt an die „London Medical Databases“, genauer der „Winter-Baraitser Dysmorphology Database“ (siehe Tabelle A.27), wodurch eine einheitliche Charakterisierung der Patienten ermöglicht wurde. Für die Pseudonymisierung der Daten diente die Nummerierung der Patientenakten aus der genetischen Beratung (Jahr der Vorstellung und Zahl des Patienten in aufsteigender Reihenfolge). Für das Anlegen einer neuen Patientendatei in der Datenbank wurden zunächst die jeweilige Nummer, das Geschlecht des Patienten und dessen Grad der MR (normal, sehr leicht [IQ 70-85], leicht [IQ 50-69], schwer [IQ 20-49], sehr schwer [IQ <20]) eingetragen. Letzterer wurde hierbei meist anhand der in den

klinischen Daten beschriebenen Entwicklungsverzögerung geschätzt, selten ließ sich ein mittels Intelligenztest bestimmter IQ eruieren. Als Grundlage für die Abschätzung wurde eine Klassifikation von Zhang et al. (2005) verwendet (siehe Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1 Klassifikation mentaler Retardierung, modifiziert nach (Zhang et al. 2005)

Gruppe	IQ	Erwachsener	Kind
0	normal	keine MR	keine MR
1	grenzwertig (<70)	langjähriger normaler Schulbesuch mit Unterstützung	Meilensteine normal, geringer Entwicklungs-rückstand ab Schulalter
2	sehr leicht (<65)	kurzer normaler Schulbesuch mit viel Unterstützung, Grundkenntnisse in Lesen, Schreiben und Rechnen	Meilensteine wenige Monate verzögert, Entwicklungsrückstand ab 2. bis 3. Lebensjahr
3	leicht (<50)	gutes Verständnis, einfache Kenntnisse in Lesen, Schreiben und Rechnen	Meilensteine mehrere Monate verzögert, Entwicklungsrückstand ab 1. bis 2. Lebensjahr
4	moderat (<35)	recht gutes Verständnis, kurze Sätze	Meilensteine mehrere Monate verzögert, Entwicklungsrückstand ab 1. Lebensjahr
5	schwer (<20)	einfaches Verständnis, 2- bis 3-Wortsätze, Laufen möglich	Meilensteine mehrere Monate bis 1 Jahr verzögert, Entwicklungsrückstand vor 1. Lebensjahr
6	sehr schwer (<10)	geringes Verständnis, Laufen unsicher mit Unterstützung, Sprechen nicht oder wenige Worte	Meilensteine mehrere Jahre verzögert, Entwicklungsrückstand vor 6. Lebensmonat
7	profund	zeigt wenig Reaktion, Sitzen vielleicht möglich, Stehen nur mit Hilfe, kaum Laufen	kein Sitzen ohne Hilfe bis zum 5. Lebensjahr

Anschließend konnten im Kopf der Patientendatei (siehe Abbildung 2.1, roter Rahmen), so weit vorhanden, allgemeine Patienteninformationen wie Alter, chromosomales Geschlecht, mütterliche XCI, Körpermaße zur Geburt und bei Vorstellung in der genetischen Beratung, notiert werden. Auf den folgenden Seiten wurden in den vier Unterpunkten „Phenotype“, „Pretesting“, „Material“ und „Images“ (siehe Abbildung 2.1, gelber Rahmen) aus vorgegebenen Feldern detaillierte Informationen zum Patienten in die Datenbank übernommen. Weiterhin konnten Informationen über die Pränatalperiode (abnormale Plazenta, Asphyxie/fetaler Notfall, Steißlage, Kaiserschnitt, verminderte fetale Bewegungen, Zangengeburt/Vakuumextraktion, Hydrops fetalis, zervikales Hygrom, intrazytoplasmatische Spermieninjektion, in-vitro-Fertilisation, vergrößerte Ventrikel, Mehrlingsgeburt, Oligohydramnion, Polyhydramnion, singuläre Nabelarterie) erfasst werden. Teratogene Risikofaktoren wurden manuell eingetragen (siehe Abbildung 2.1, grüner Rahmen).

MRNet

Patient ID	MD107/09		Index Patient*	yes	Ext. Clinic		Last updated	24.05.2013			
Family ID	MD107/09	Cons. MRNet	Patient is*	Affected	Relation	Index Patient	Created	06.06.2011			
Years/Months	0	1	IQ	unspecified	Birth	Weeks of gest.	30	Years/Months	1	5	
Age i. months	1		IQ-Method	estimated	Height i. cm/SDS	39	-0,39	Age i. months	17		
Chrom.Sex	XV	Sus. Inher.	AD	AR	XL	YL	Weight i. g/SDS	1230	-0,67	Weight i. kg/BMI	
Gender*	male	Ethnicity*	European	Parent. consang.*	no	OFC i. cm/SDS	27,5	-0,5	OFC i. cm/SDS	42	-4,82
Country	Germany	Mat. X-inact.									
Note	Cervixinsuffizienz, V.a. Amnioninfektionssyndrom; postnatal: Atemnotsyndrom, Neugeborenensepsis, Hyperbilirubinämie; untere Extremität: wechselnder Muskeltonus										
Mutation in											
Diagnosis	unauffällig: FISH (Trisomie 21, Subtelomersonde MIX1)										
OMIM		PubMed PMID									
Consent for	External cooperation*	no	Photo in publication*	no							
	Any research*	no	Result information MRnet*	no							
	Photo in MRnet database*	no	Result information any disorder*	no							
	Photo in presentation*	no	Ensemble								
					MRnet family members	PatientID	double click to get there	Patient is			
					Index Patient	MD107/09		Affected			
					create new family member						
					External family members	Comment	Status				
					add delete						

Phenotype | Pretesting | Material | Images

London Dysmorphology DB phenotype

Primary	Secondary	Tertiary	Status*
NEUROLOGY	MENTAL, COGNITIVE FUNCTION, general abnormalities	Mental retardation/developmental delay	yes
HANDS	Dermatoglyphics, general abnormalities	Single palmar crease	yes
NEUROLOGY	SEIZURES, general abnormalities	SEIZURES, general abnormalities	yes
NEUROLOGY	CEREBROVASCULAR CHANGES, general abnormalities	Haemorrhage/haematoma in CNS	yes
NEUROLOGY	CRANIUM, general abnormalities	Microcephaly	yes
NEUROLOGY	MENTAL, COGNITIVE FUNCTION, general abnormalities	Hypotonia (non-myopathic)	yes
URINARY SYSTEM	Kidneys, general abnormalities	Renal stones/calcification	yes
ABDOMEN	Abdomen, general abnormalities	Umbilical hernia	yes
ABDOMEN	Abdomen, general abnormalities	Inguinal hernia	yes
NEUROLOGY	NEURORADIOLOGY CONT, general abnormalities	Hydrocephalus/large ventricles, non-specific	yes
THORAX	Heart, general abnormalities	Patent ductus arteriosus	yes
BACK AND SPINE	Back and spine, general abnormalities	Scoliosis	yes
EYES, GLOBES	Optic disc and nerve, general abnormalities	Optic atrophy	yes
NEUROLOGY	MICROSCOPIC CHANGES OF THE CNS, general abnormalities	Microscopic changes of the CNS, general abnormalities	yes

add delete

Prenatal phenotype

Cesarean section

add delete

Teratogenic risk

Nikotin (Toxikomanie)

add delete

Abbildung 2.1 Patientendatei

Das rot umrandete Feld zeigt den Patientenkopf mit allgemeinen Informationen wie Geschlecht, Geburts- und Körpermaßen. Der gelbe Kasten verweist auf die vier Kategorien „Phenotype“, „Pretesting“, „Material“ und „Images“, mithilfe derer der Patient genau beschrieben werden kann. Die grüne Markierung beinhaltet Informationen zur pränatalen Periode und den teratogenen Risikofaktoren während der Schwangerschaft.

Der Unterpunkt „Phenotype“ erfasste körperliche Auffälligkeiten. Er war in drei Kategorien unterteilt. Die erste Kategorie klassifizierte in alphabetischer Reihenfolge das betroffene Organsystem im Allgemeinen (Abdomen, Rücken/Wirbelsäule, Blutgefäße [extrakraniell], Körperbau, Ohren, endokrines System, zu den Augen gehörende Strukturen, Augäpfel, Gesicht, Füße, Stirn, Genitalien, Hämatologie/Immunologie, Haare, Hände, Gelenke, untere Extremitäten, Mund, Nägel, Nacken, Neurologie, Nase, Mundregion, Becken, Skelettsystem, Haut, Gestalt, Zähne, Thorax, obere Extremitäten, Harntrakt, Stimme). Die zweite und dritte Kategorie definierten die Auffälligkeit am Organ genauer. Die Untergruppe „Pretesting“ diente der Erfassung von bereits durchgeführten diagnostischen Verfahren. Sie wurde in zwei Gruppen unterteilt. Die erste „Karyotyping“ erfasste, ob ein Karyogramm mit der gängigen Färbemethode G-bands by Trypsin using Giemsa (GTG)-Bänderung erstellt wurde und in welcher Auflösung dies geschah. Die zweite Gruppe „Molecular Testing“ beinhaltete verschiedene molekulargenetische Verfahren, beispielsweise die Array-based Comparative Genomic Hybridization (Array-CGH), die Untersuchung des *FMR1*-, *UBE3A*- und *MECP2*-Gens, Methylierungsanalysen des Chromosoms 15 sowie einige weitere Analysen bezüglich häufiger Ursachen für eine Entwicklungsstörung. In der Untergruppe „Material“ wurde das Vorhandensein von Material wie DNA oder RNA vom Patienten oder dessen Familienangehörigen erfasst. In der vierten Untergruppe „Images“ wurden mit Patienteneinverständnis Fotos des Patienten aus verschiedenen Perspektiven eingefügt. Nach beendeter Eingabe der Daten war es möglich, eine Suchfunktion zu aktivieren und nach bestimmten Eigenschaften zu filtern (siehe Abbildung 2.2).

Abbildung 2.2 Suchfunktion der Datenbank

Durch Auswahl der gewünschten Informationen in den weißen Feldern und Übernahme dieser in die gelb hinterlegten, kann entweder nach einzelnen Fakten oder nach Kombinationen gesucht werden. Die Datenbank erstellt hierfür eine Liste mit den Nummern aller Patienten, die die jeweiligen Eigenschaften besitzen.

2.3 Statistische Verfahren

Die Zusammenstellung des Datensatzes erfolgte mithilfe der Suchfunktion der Datenbank. Aufgrund einer fehlenden Schnittstelle zwischen der verwendeten Datenbank und gängigen Statistik-Softwares, wurde ein Teil der Daten zusätzlich in Microsoft® Office Excel® für Windows (Version 2007) aufgenommen und mithilfe von SPSS (Version 19) statistisch analysiert. Die deskriptive Aufarbeitung der Daten geschah anhand des Mittelwertes, des Medians und anhand von Maximal- und Minimalwerten. Die Signifikanztests auf Unabhängigkeit erfolgten durch den Chi-Quadrat-Test und bei geringem Stichprobenumfang durch den exakten Test nach Fisher. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant, von $<0,01$ als sehr signifikant und von $<0,001$ als hoch signifikant gewertet (Johnson 2013). Dichotome Merkmale wurden durch das 95%-Konfidenzintervall (KI) nach Clopper-Pearson überprüft. Dieses wurde für den Literaturvergleich herangezogen und wie folgt angegeben [KI: untere Grenze; obere Grenze].

2.4 Labormethoden

Nachfolgend werden die Labormethoden beschrieben, die für ausgewählte Patienten zur weitergehenden Analyse verwendet wurden. Bei den in den Kapiteln 2.4.1 bis 2.4.8 erwähnten Methoden fanden die in der Tabelle A.1 bis Tabelle A.8 aufgeführten Materialien Anwendung.

2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion

2.4.1.1 Grundlagen

Die in der Mitte der 1980er Jahre von Kary Mullis entwickelte PCR ist eine zyklische Methode zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen. Sie dient zum einen der Vervielfältigung spezifischer Sequenzabschnitte, zum anderen dem Nachweis bekannter Nukleinsäuresequenzen (Mullis et al. 1986). Ihr Prinzip ähnelt dem der in vivo ablaufenden Replikation. Eine DNA-Polymerase synthetisiert einen DNA-Strang entlang einer DNA-Matrize (Template). In vitro wird dafür letztere zunächst bei einer Temperatur von 90-94°C (95°C) denaturiert. Zum Start der Reaktion wird ein synthetisch hergestelltes Primerpaar benötigt. Primer sind 20 bis 25 Basen lange Oligodesoxyribonukleotide (Peake 1989), die jeweils zu einem Strang der Ausgangs-DNA komplementär sind. Sowohl der Vorwärts- (F- oder forward-) als auch der Rückwärts- (R- oder reverse-) Primer können jeweils über Basenpaarung an einem Strang der Ausgangs-DNA hybridisieren (Annealing). Diese Bindung findet bei einer Reaktionstemperatur zwischen 40 und 70°C statt. Die Primer dienen als Startpunkt für die Synthese der DNA, da das Enzym DNA-Polymerase die Verknüpfung der vier verschiedenen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) nur an einem freien 3'-OH-Ende beginnen kann. Da der Reaktionsansatz im Verlauf der Reaktion mehrmals erwärmt wird, wird als DNA-Polymerase ein hitzestabiles Enzym benutzt. Es wird

aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen (Taq-Polymerase). Dieses Enzym ermöglicht viele PCR-Zyklen ohne erneute Zugabe von Enzymen (Saiki et al. 1988). Nach beendeter DNA-Synthese, die bei 70-72°C stattfindet, stehen die entstandenen Reaktionsprodukte wieder als Ausgangs-DNA für den nächsten Reaktionszyklus zur Verfügung. Insgesamt wird ein Zyklus aus Denaturierung, Annealing und DNA-Synthese (Elongation) etwa 30-mal wiederholt, sodass am Ende eine Kopienzahl von 10^6 - 10^7 entsteht. Daraus ergibt sich, dass am Anfang eine geringe Menge DNA eingesetzt werden kann. Insgesamt zählt die PCR zu einer der am häufigsten verwendeten Methoden in molekularbiologischen Laboren (Boehm 1989).

2.4.1.2 Durchführung

Die PCR-Primer wurden mittels Genbank-Sequenzen der UCSC Genome Bioinformatics Group (siehe Tabelle A.27) und der Primer Design Software (Primer-3) des Whitehead Institute for Biomedical Research (siehe Tabelle A.26) entworfen. Um auszuschließen, dass in der Region, in der Primer banden, ein Polymorphismus oder eine Repeat-Region zu finden war, wurde der Primer über das „BLAT Search Genome“ mit der Sequenzdatenbank der UCSC Genome Bioinformatics Group (siehe Tabelle A.27) verglichen und anschließend bei der Firma Thermo-Fisher Scientific bestellt. Die gelieferten Primer wurden nach Herstellerangaben mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) gelöst und für eine Stunde auf dem Schüttler gemischt. Die Stock-Lösung (100 pmol/µl) wurde auf 2,5 pmol/µl verdünnt. Anhand einer Kontroll-DNA wurde die Funktionsfähigkeit der Primer getestet (PCR, Gelelektrophorese, Sequenzierung). Für Familie A wurden die Primer für Exon 8 (F und R, siehe Tabelle A.9) des *BRWD3*-Gens, für Familie B die Primer 9-10F, 14R, 32-33F und 37R (siehe Tabelle A.9) des *BRWD3*-Gens und für Familie C die Primer für Exon 1 (F und R, siehe Tabelle A.10) des *KCND1*-Gens genutzt. Pro Well einer PCR-Platte wurden je 2 µl des verdünnten Vorwärts- und Rückwärtsprimers pipettiert und zentrifugiert. Anschließend wurden jeweils 15,3 µl Master-Mix (siehe Tabelle A.17) und 0,7 µl DNA hinzugegeben, sodass ein PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20µl entstand. Dieser wurde nochmals zentrifugiert und danach für 2 Stunden und 45 Minuten zum Amplifizieren in den Thermocycler gestellt (Standardprogramm Erlangen65, siehe Tabelle A.12). Als Template wurde neben der genomischen DNA auch cDNA, die mithilfe des Enzyms reverse Transkriptase aus RNA hergestellt wurde, verwendet. Die fertig umgeschriebene cDNA wurde vom Institut zur Verfügung gestellt. Der Erfolg der PCR wurde anhand einer Gelelektrophorese getestet.

2.4.2 Gelelektrophorese

2.4.2.1 Grundlagen

Eine Gelelektrophorese dient der Trennung von geladenen Molekülen unterschiedlicher Größe mithilfe eines elektrischen Feldes und eines Trägers und somit unter anderem dem Nachweis eines

größendefinierten PCR-Produkts. Als Träger können entweder Polyacrylamid- oder Agarosegele, die vor allem zur Trennung großer Moleküle über 10 nm Durchmesser dienen, verwendet werden. Mithilfe von Agarosegelen können lineare DNA-Fragmente in einer Größenordnung von 0,1-60 kb getrennt werden. Die elektrophoretische Beweglichkeit von geladenen Molekülen hängt von ihrer Gesamtnettoladung, ihrer Größe und Gestalt, der Porengröße des Gels, der elektrischen Feldstärke und den Eigenschaften des Puffers (Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke) ab (Brody und Kern 2004). DNA ist aufgrund seiner Phosphatreste negativ geladen und bewegt sich somit bei Anlegen einer Spannung in Richtung Anode. Durch ultraviolettes (UV) Licht können die Fragmente sichtbar gemacht werden. Dies wird durch Zugabe von Ethidiumbromid in das noch nicht erstarrte Gel ermöglicht. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der DNA-Moleküle und ändert dabei sein Absorptionsspektrum. Bei Anregung mit UV-Licht wird der Komplex aus Nukleinsäure und Ethidiumbromid im Bereich von 500-590 nm als orange leuchtende Bande sichtbar (Aaij und Borst 1972).

2.4.2.2 Durchführung

Zum Gießen eines Agarosegels wurde die Agarose mit Aqua dest. und 1x Tris-Borat-EDTA (Ethylendiamintetraacetat) (TBE) Elektrophoresepuffer vermischt und in einer Mikrowelle aufgekocht bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Die Mengenangaben richteten sich nach der gewünschten Anzahl und der Konzentrierung der Gele (Tabelle 2.2)

Tabelle 2.2 Anleitung zur Herstellung von Agarosegelen

	1%iges Gel	2%iges Gel	2,5%iges Gel
Standard-Agarose	1 g	2 g	2 g
Nusieve-Agarose	-	-	0,5 g
1xTBE-Puffer	100 ml	100 ml	100 ml

Der durch das Erhitzen entstandene Flüssigkeitsverlust musste mit Aqua dest. aufgefüllt werden. Zu dem noch nicht erstarrten Gel wurden 10 µl Ethidiumbromid gegeben und dieses mithilfe eines Magnetrührers untergemischt. Nach einer 10-minütigen Abkühlungsphase (auf 50-60°C) wurde die Mischung blasenfrei in eine mit Kämmen bestückte Gelkammer gefüllt. Dort kühlte sie weiter auf Raumtemperatur herunter und verfestigte sich. Nach Entfernen der Kämmen entstanden Taschen, die mit den Proben beladen werden konnten. Das fertig gegossene Gel wurde in eine mit Pufferlösung (TBE) gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Dabei musste drauf geachtet werden, dass die Pufferlösung das Gel gut überschichtet. Das PCR-Produkt (5 µl) wurde mit einem Ladepuffer (5 µl) vermischt und anschließend in die einzelnen Taschen des Gels pipettiert. Der Ladepuffer hielt das PCR-Produkt in den Taschen und machte es sichtbar. Für die Auswertung wurde eine Tasche mit einem Längenstandard (Ladder) befüllt. Dieser zeigte in 100 bp- bzw. 1 kb-Schritten die Länge der amplifizierten DNA-Moleküle. Je nach Größe des Gels wurde schließlich für circa 40 Minuten eine

Spannung zwischen 80 und 120 V angelegt. Der letzte Arbeitsschritt bestand darin, das Gel mithilfe des Geldokumentationssystems „DeVision DBOX with Transilluminator“ mit UV-Licht zu beleuchten, die Banden damit sichtbar zu machen und ein digitales Bild herzustellen.

2.4.3 Aufreinigung des PCR-Ansatzes

Um mit dem PCR-Produkt eine Sequenzierung durchführen zu können, musste dieses von überschüssigem Material aus der PCR (Salze, dNTPs, Primer) gereinigt werden. Vor allem die noch vorhandenen dNTPs hätten das für die Sequenzierung genau definierte Verhältnis von ddNTP (Didesoxyribonukleosidtriphosphate)/dNTP gestört. Des Weiteren konnten überschüssige Primer die Spezifität der Sequenzierungsreaktion für eine Leserichtung beeinträchtigen. Die Aufreinigung geschah vollautomatisch mithilfe eines Roboters und der „Biomek® Software“ (Programm: „AGCT AMPure 96 Magdeburg_no dilution“, siehe Tabelle A.26). Es wurden magnetische Partikel (AMPure®-Beads) genutzt, um die DNA zu binden. Anschließend wurde das PCR-Produkt mittels 70%igem Ethanol von allen überschüssigen Materialien getrennt. Im letzten Schritt wurde die gebundene DNA durch Wasser wieder ausgewaschen, in eine neue Platte pipettiert und stand nun für die Sequenzierung zur Verfügung (Beckman Coulter 2009).

2.4.4 DNA-Sequenzierung

2.4.4.1 Grundlagen

Unter dem Wort Sequenzierung versteht man die Bestimmung der Basenreihenfolge in einem DNA-Molekül. Am häufigsten dazu verwendet wird die enzymatische Methode nach Sanger (Sanger et al. 1977), auch Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidmethode genannt. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte dienen diese als Template. Durch Denaturierung bei 95°C werden die beiden DNA-Einzelstränge frei, an die die Primer, die auch für die PCR verwendet wurden, binden können. Dieses geschieht bei einer Annealingtemperatur zwischen 40 und 70°C in zwei getrennten Ansätzen, das heißt einem Ansatz für den Vorwärts-, einen für den Rückwärtsprimer. Nach Bindung der Primer synthetisiert die thermostabile DNA-Polymerase einen zum Template komplementären Strang, indem sie an das 3'-OH-Ende des Primers dNTPs anknüpft. Das Besondere an der Methode nach Sanger ist, dass sich im Reaktionsansatz nicht nur dNTPs, sondern auch vier verschiedene ddNTPs befinden. Diese besitzen keine 3'-Hydroxygruppe und sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Wenn eines dieser ddNTPs in die laufende Reaktion eingebaut wird, kommt es zum Kettenabbruch, da die DNA-Polymerase keine Möglichkeit hat, eine Phosphorsäure-Esterbindung zwischen ddNTP und einem neuen Nukleotid zu bilden (França et al. 2002). Die entstandenen Fragmente sind durch gleiche 5'-, aber unterschiedliche 3'-Enden, die je nach endständiger Base mit einem der vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe markiert sind, gekennzeichnet. Es folgen wie bei der PCR mehrere Zyklen aus

Denaturierung, Annealing und Elongation/Kettenabbruch. Durch dieses Prinzip entstehen viele unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die mittels Kapillarelektrophorese getrennt werden können. Dabei wandern die DNA-Moleküle durch ein POP-7-Polymer-Gel an einem Laseranregungs- und Detektionssystem vorbei. Der Laser regt den Fluoreszenzfarbstoff zur Lichtemission an, welche von Photosensoren detektiert, computergestützt verarbeitet und grafisch dargestellt wird (Detwiler et al. 2004).

2.4.4.2 Durchführung

In eine spezielle Sequenzierplatte (Fast-Platte) wurden pro Well 0,6 µl einer 2,5 pmol/µl Verdünnung entweder des Vorwärts- oder des Rückwärtsprimers vorgelegt. Es wurden die gleichen Primer wie bei der jeweiligen PCR verwendet und zusätzlich bei Familie B der 34-35FSeq-Primer. Nach Zentrifugation wurden pro Well 3,9µl des Master-Mixes (siehe Tabelle A.18) und 0,5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt hinzu pipettiert, sodass ein Gesamtreaktionsansatz mit einem Volumen von 5 µl entstand. Es wurde erneut zentrifugiert und die Fast-Platte anschließend für den Ablauf der Sequenzierreaktion in den Fast-Cycler gestellt (Programm ABI SEQ_1min_5µl, siehe Tabelle A.13). Die eigentliche Sequenzierung erfolgte mit dem Sequenzierer „3500xL Genetic Analyzer“ vom Unternehmen Applied Biosystems und der Software „3500 Data Collection Software“ (siehe Tabelle A.26). Die Ergebnisse wurden mit dem Computerprogramm „SEQUENCE Pilot“ der Firma JSI medical systems (siehe Tabelle A.26) vergleichend mit Referenzsequenzen der Ensemble-Datenbank (siehe Tabelle A.27) ausgewertet. Die Bezeichnung der Mutationen basierte auf der Nomenklatur der Human Genome Variation Society (siehe Tabelle A.27).

2.4.5 Aufreinigung des Sequenzier-Ansatzes

Bevor die Produkte der Sequenzierreaktion in den Sequenzierer geladen werden konnten, musste das Sequenzierprodukt aufgereinigt werden. Insbesondere nicht verbrauchte ddNTPs hätten die Kapillarelektrophorese und Detektion stören können. Die Aufreinigung wurde ebenfalls vollautomatisch mittels eines Pipettier-Roboters und der „Biomek® Software“ (Programm: „AGCT CleanSEQ Magdeburg No Transfer“, siehe Tabelle A.26) durchgeführt. Mithilfe von magnetischen Partikeln (CleanSEQ-Beads) wurden die Sequenzierprodukte gebunden, sodass mit 85%igem Ethanol überschüssige Reagenzien entfernt werden konnten. Wasser hat die gebundenen Sequenzierprodukte wieder ausgewaschen und stellte sie so zur Auswertung zur Verfügung (Beckman Coulter 2007).

2.4.6 Multiplex-PCR

2.4.6.1 Grundlagen

Das Prinzip der Multiplex-PCR entspricht dem der Standard-PCR. Der Unterschied besteht darin, dass in einem Reaktionsgefäß mehrere PCR-Reaktionen gleichzeitig ablaufen. Anstatt mittels eines Primer-Paares ausschließlich identische DNA-Sequenzen zu amplifizieren, entstehen bei der Multiplex-PCR aufgrund der Verwendung mehrerer Primer-Paare verschiedene PCR-Produkte in einem Reaktionsansatz. Die Multiplex-PCR ermöglicht so eine schnelle und kostengünstige Untersuchung mehrerer unterschiedlicher Fragmente einer bestimmten DNA-Probe. Sie birgt aber auch Probleme beispielsweise in Form von Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Primern (Bildung von Primer-Dimeren) oder der Bildung unspezifischer Produkte. Dieses Verfahren wird vor allem für die Untersuchung von Abstammungs- und Verwandtschaftsbeziehungen verwendet (Markoulatos et al. 2002).

2.4.6.2 Durchführung

Es wurde ein Primer-Mix (siehe Tabelle A.19) aus sechs Primerpaaren des *BRWD3*-Gens hergestellt. Dieser beinhaltete die Primerpaare der Exons 4, 24, 27, 32-33, 34 und 35. Sie wurden aufgrund der unterschiedlichen Fragmentlängen (siehe Tabelle A.9) ihrer Produkte ausgewählt, um diese später mithilfe der Gelelektrophorese trennen und eindeutig identifizieren zu können. Zur Herstellung des Primer-Mixes wurden die Stock-Lösungen der Primer mit einer Konzentration von 100 pmol/µl verwendet. Je 1 µl jedes Primers wurde zusammenpipettiert und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Pro Reaktionsansatz wurden 2,5 µl einer 1:10 Verdünnung dieses Mixes benutzt und mit 12,5 µl Multiplex PCR Master Mix von QIAGEN und 500 ng DNA vermischt. Um auf ein Reaktionsvolumen von 25 µl zu kommen, wurde, je nach eingesetztem DNA-Volumen, mit einer variablen Menge an Aqua dest. aufgefüllt. Die Amplifizierung erfolgte im Thermocycler (siehe Tabelle A.14). Die Ergebnisse wurden mithilfe der Gelelektrophorese (2,5%iges Gel) ausgewertet.

2.4.7 Long-Range PCR

2.4.7.1 Grundlagen

Im Gegensatz zur Standard-PCR werden bei der Long-Range PCR längere, bis zu 40 kb umfassende, DNA-Sequenzen amplifiziert. Da die normalerweise verwendete Taq-Polymerase nur Fragmentlängen bis 5 kb amplifizieren kann, finden bei der Long-Range-PCR andere Polymerasen Anwendung. Im Normalfall ist das eine Kombination aus zwei thermostabilen Polymerasen (Barnes 1994). Eine Taq-Polymerase mit hoher Umsatzrate und eine proofreading-Polymerase, die durch ihre

Korrektureigenschaften den vorzeitigen Kettenabbruch bei Einbau einer falschen Base verhindert, werden gemischt (Khare und Eckert 2002).

2.4.7.2 Durchführung

Es wurden die 2,5 pmol/µl-Verdünnungen der Primer (32-33F, 35R, siehe Tabelle A.9) verwendet. Je 2,5 µl des Vorwärts- und des Rückwärtsprimers wurden mit 18,5 µl des Master Mix' (siehe Tabelle A.20) und 1,5 µl DNA (100 ng/µl) vermischt, sodass ein Gesamtvolumen von 25 µl entstand. Die Amplifizierungsreaktion fand im Thermocycler (siehe Tabelle A.15) statt. Zur Auswertung der Ergebnisse diente die Gelelektrophorese. Hierbei war zu beachten, dass durch die Größe der Reaktionsprodukte 1%ige Gele und ein 1 kb-Ladder verwendet wurden.

2.4.8 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

2.4.8.1 Grundlagen

Die MLPA ist eine Methode zur Quantifizierung von DNA-Kopien, die komplementär zu den verwendeten spezifischen Sonden sind. Sie wird unter anderem für die Identifizierung von Dosisunterschieden (zum Beispiel Deletionen, Duplikationen) genomischer DNA verwendet. In einem Reaktionsansatz können bis zu 40 Zielsequenzen untersucht werden. Das besondere an der MLPA ist, dass nicht die zu untersuchende DNA, sondern die eingesetzten Sondenpaare amplifiziert werden. Jede Sonde besteht aus drei Anteilen, einem zur Ziel-DNA komplementären Anteil (Hybridisierungssequenz), einem für jede Sonde spezifisch langen Abschnitt (Stuffer-Sequenz) und einer Universalprimer-Sequenz (siehe PCR-Primer-Sequenz X und Y in Abbildung 2.3). Die Universalprimer-Sequenz ist bei allen Sonden gleich, wodurch bei der MLPA nur ein Primerpaar benötigt wird. Es ist nur eine geringe Ausgangsmenge an DNA nötig (Minimum 20 ng). Diese wird bei 95°C denaturiert und bei Hybridisierungstemperaturen von 60°C lagern sich die Sonden komplementär an die Zielsequenz an. Dabei sind die Sondenpaare so konstruiert, dass sie an unmittelbar benachbarte Nukleinsäuresequenzen hybridisieren und so anschließend durch eine Ligase bei 54°C ligiert werden können. Nur nach erfolgreicher Ligation kann die Amplifizierung der Sonden erfolgen und später ein Signal generiert werden (siehe Abbildung 2.3). Durch die unterschiedlich langen Stuffer-Sequenzen entsteht eine Mischung aus verschieden langen amplifizierten Fragmenten (130-480 Nukleotide), die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind und mittels Kapillarelektrophorese der Größe nach getrennt werden. Es ist auch möglich, die Stuffer-Sequenzen wegzulassen. Der Längenunterschied der einzelnen Fragmente, der zur Auftrennung und Auswertung notwendig ist, wird dabei durch die verschieden langen Hybridisierungssequenzen erreicht. Dieses Verfahren wird hier angewandt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt quantitativ, indem die Lichtsignale detektiert und die Unterschiede in ihrer Intensität als unterschiedliche Flächen unterhalb

der Peaks gekennzeichnet werden. Als Referenzwert dienen hierbei die Flächen unterhalb der Peaks der für jede MLPA-Reaktion obligatorisch mit untersuchten Kontroll-DNA-Proben. Definitionsgemäß handelt es sich um eine heterozygote Deletion bei einem Flächenunterschied von unter 75% im Vergleich zum Referenzwert und um eine heterozygote Duplikation bei einer Differenz zwischen den Flächen von über 125%. Verwendet wird die MLPA zur Identifizierung von kleinen Kopienzahlveränderungen von DNA- und RNA-Sequenzen, zur relativen Quantifizierung von messenger (m) RNA und zur Bestimmung des Methylierungsstatus von Promotorregionen. Dagegen können keine Veränderungen, die ohne Dosisveränderungen (zum Beispiel balancierte Translokationen) einhergehen, detektiert werden (Schouten et al. 2002).

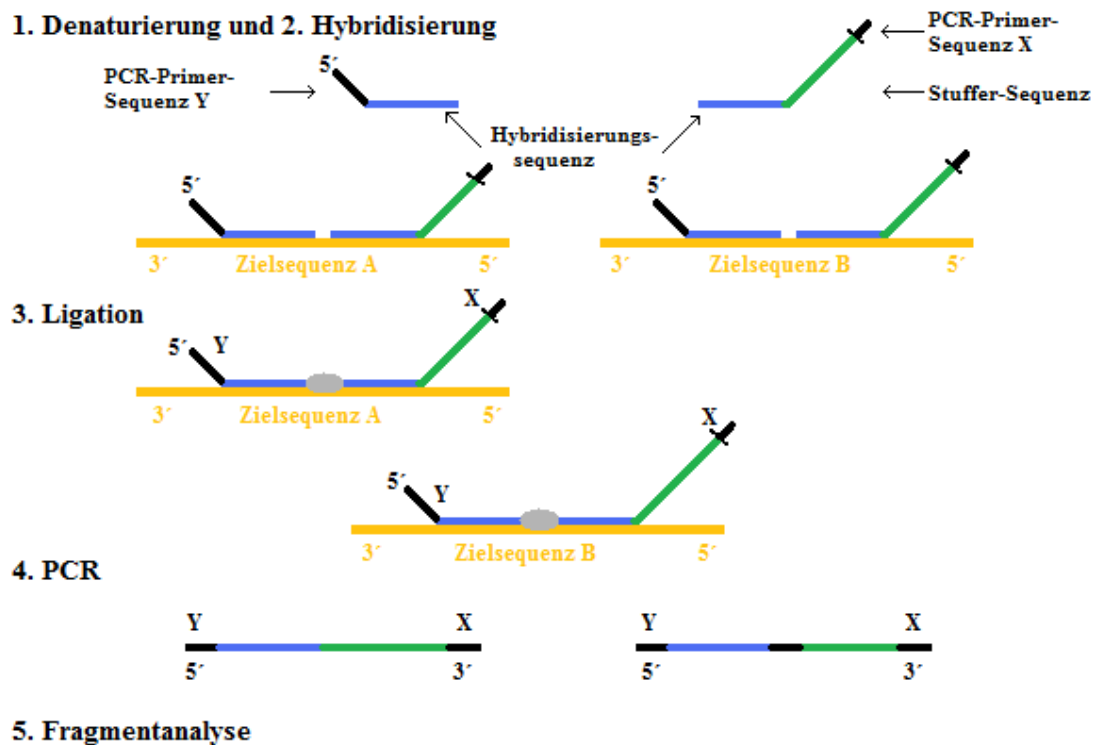


Abbildung 2.3 Schema der einzelnen MLPA-Schritte, modifiziert nach (Schouten et al. 2002)

Die Abbildung zeigt die fünf Hauptschritte der MLPA. Nach Denaturierung hybridisieren die Sonden, bestehend aus drei verschiedenen Abschnitten (Hybridisierungssequenz, Stuffer-Sequenz, PCR-Primer-Sequenz X bzw. Y), an die Ziel-DNA. Nach erfolgreicher Ligation folgt die PCR und anschließend die Fragmentanalyse.

2.4.8.2 Durchführung

Je 100 ng DNA (5 µl einer 20 ng/µl-Verdünnung) wurden im Thermocycler 5 Minuten bei 95°C denaturiert und nach Abkühlen auf 25°C wurden pro Probe 3 µl Hybridisierungs-Mastermix (siehe Tabelle A.21) hinzugegeben. Für den eigenen Probemix (siehe Tabelle A.24) wurden jeweils die rechten und linken Oligonukleotid-Sonden (siehe Tabelle A.11) verwendet, sodass ein Gesamtvolumen von 14,4 µl entstand. Dieses wurde mit Tris-EDTA auf 200 µl aufgefüllt. Nach einminütiger Inkubation bei 95°C folgte die 16-stündige Hybridisierung bei 60°C. Anschließend wurden die Proben auf 54°C herunter gekühlt und jeweils 32 µl Ligase-Mastermix (siehe Tabelle A.22) hinzugefügt. Es folgte für 15 Minuten die Ligation bei 54°C und anschließend die 5-minütige

Inaktivierung der Ligase bei 98°C. Je 5 µl der auf 15°C herunter gekühlten Ligationsprodukte wurden mit 13 µl Ampuwa und 2 µl PCR-Puffer vermischt und in den auf 60°C vorgeheizten Thermocycler gestellt. Pro Reaktionsgefäß wurden 5 µl Polymerase-Mastermix (siehe Tabelle A.23) hinzugegeben und es wurde in circa 2 Stunden eine PCR (Programm siehe Tabelle A.16) durchgeführt. Abschließend wurde 1 µl der Probe mit 10 µl Lade-Mix (siehe Tabelle A.25) vermengt, im Thermocycler für 2 Minuten bei 80°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und schließlich zur Fragmentanalyse in das Sequenziergerät geladen.

2.4.9 Next Generation Sequencing

2.4.9.1 Grundlagen

Bei genetisch heterogenen, phänotypisch überlappenden oder schlecht abgrenzbaren Erkrankungen ist die Sequenzierung nach Sanger unwirtschaftlich. Die Stufendiagnostik benötigt viel Zeit und das simultane Ansetzen aller Reaktionen ist sehr kostenintensiv. Neue Sequenziertechnologien (Next-Generation Sequencing) bieten hierbei Vorteile. Es können parallel viele DNA-Proben (Multiplexing) und/oder viele verschiedene Zielregionen (Hochdurchsatz) sequenziert werden. Hierbei werden Probenvorbereitungen mit (zum Beispiel Gen-Panels oder Exome-Sequenzierung) und ohne Anreicherung (Genome-Sequenzierung) unterschieden. Die Anreicherung kann auf verschiedene Arten erfolgen. Generell unterscheidet man hybridisierungs-basierende und Amplikon-basierende Anreicherungsverfahren. Bei den hybridisierungs-basierenden Verfahren werden zu den Zielsequenzen komplementäre Sonden eingesetzt, um diese in der fragmentierten DNA-Probe anzureichern. Beim Exome-Sequencing, der Sequenzierung aller kodierenden Sequenzen, oder beim sogenannten X-Exome-Sequencing, also der Sequenzierung aller kodierenden Sequenzen des X-Chromsoms wird dieses Anreicherungsverfahren eingesetzt. Dahingegen werden bei Amplikon-basierenden Verfahren, analog zur PCR, Primerpaare zur Amplifikation der Zielregion eingesetzt. Hierbei kann die Amplikongröße sehr einfach durch die Lokalisation der Primer bestimmt werden, sodass auch niedrig-qualitative Proben, wie zum Beispiel FFPE-Proben (Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete Proben) als Ausgangsmaterial eingesetzt werden können, die zum Teil nur die Amplifikation sehr kleiner Amplikons (<200 bp) ermöglichen (Abel und Duncavage 2013; Watson et al. 2014).

2.4.9.2 Durchführung

Die X-Exome Sequenzierung und Auswertung der Indexe aus Familie A und C wurde extern im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation am Departement of Medical Genetics in Utrecht von Magdalena Harakalova durchgeführt. Die Ergebnisse wurden anschließend im Rahmen dieser Arbeit validiert und die Segregation in den Familien untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 Datenbankanalyse

3.1.1 Soziodemografische Struktur der Kohorte

Insgesamt wurden im Zeitraum 2000 bis 2012 621 Patienten unter den oben genannten Schlüsselbegriffen in der genetischen Beratung vorgestellt. Nicht alle Patientendaten wurden in die Datenbank übernommen. So wurden beispielsweise Daten Gesunder ausgeschlossen, die sich im Rahmen der Schwangerschaftsberatung aufgrund betroffener Familienangehöriger vorstellten. Letztlich wurden 588 Patienten mit einer Entwicklungsverzögerung in die Datenbank eingetragen. Weitere 11 gesunde Familienmitglieder wurden zumeist aufgrund ihrer Überträgerereigenschaften mit in die Datenbank aufgenommen. Die folgende Auswertung bezieht sich auf die 588 Betroffenen. 61,6% (362/588) der Patienten waren männlich, 38,4% (226/588) weiblich. Es ergab sich somit ein Geschlechterverhältnis von 1,6:1. Die Betrachtung der Altersverteilung zeigte, dass 18,0% (106/588) der Patienten im Säuglingsalter (<1 Jahr) und 17,3% (102/588) im Kleinkindalter (1 bis <3 Jahre) vorgestellt wurden. In der frühen Kindheit (3 bis <6 Jahre) waren es 26,4% (155/588), in der mittleren Kindheit (6 bis <10 Jahre) 16,0% (94/588) und in der späten Kindheit (10 bis <14 Jahre) 8,9% (52/588). Adolescent und älter (14 bis <58 Jahre) waren 13,4% (79/588) aller Vorgestellten. Die Einteilung erfolgte nach (Brockhaus 2015). Die meisten Patienten wurden innerhalb der ersten acht Lebensjahre vorgestellt (72,3% [425/588]). Die ausführliche Altersverteilung, aufgespalten in männliche und weibliche Betroffene, gibt Abbildung 3.1 wider. In den meisten Altersgruppen überwog das männliche Geschlecht. Ab dem 15. Lebensjahr war das Geschlechterverhältnis nahezu ausgeglichen.

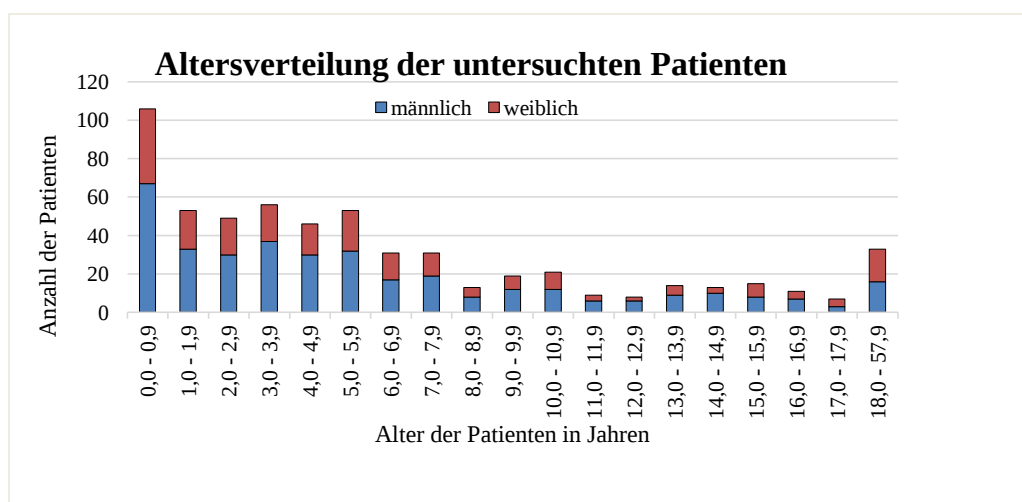


Abbildung 3.1 Altersverteilung der untersuchten Patienten

Die Abbildung zeigt die Altersverteilung der untersuchten Patienten, aufgeteilt auf beide Geschlechter. Die meisten Patienten wurden kurz nach der Geburt vorgestellt. Bis zum achten Lebensjahr (Geburt-7,9 Jahre) wurden durchschnittlich pro Lebensjahr 53 Patienten untersucht, anschließend (8,0-17,9 Jahre) handelte es sich um durchschnittlich 13 Patienten pro Lebensjahr, folgend (18,0-57,9 Jahre) nur um einen Patienten pro Lebensjahr.

Im Verlauf der betrachteten Jahre zeigte sich, dass in den letzten beiden Untersuchungsjahren zwei- bis dreimal so viele Patienten mit Entwicklungsverzögerung in der genetischen Beratung vorgestellt wurden wie in den Jahren zuvor. Die wenigsten Vorstellungen erfolgten in den ersten zwei Untersuchungsjahren. Die Zunahme der Patientenzahlen ist durch den Fortschritt der diagnostischen Möglichkeiten und dem veränderten diagnostischen Schwerpunkt in Richtung der pädiatrischen Genetik im Institut für Humangenetik durch den Wechsel der Institutsleitung im Herbst 2009 zu begründen. Im Rahmen des letzteren wurden gezielt bereits vorgestellte Patienten angeschrieben und bei Interesse erneut einbestellt und molekulargenetisch untersucht. Das mittlere Untersuchungsalter lag bei 6,4 Jahren. Die jüngsten Patienten wurden kurz nach der Geburt vorgestellt, der älteste Patient im 58. Lebensjahr. Das mediane Untersuchungsalter aller Jahrgänge lag bei vier Jahren. Im Jahr 2005 war es mit zwei Jahren am geringsten und im Jahr 2010 mit sieben Jahren am höchsten. Tabelle 3.1 gibt einen detaillierten Überblick, wie viele Patienten in den einzelnen Jahren untersucht wurden, wie viele davon männlich bzw. weiblich waren und stellt das jeweilige mittlere und mediane Untersuchungsalter dar.

Tabelle 3.1 Anzahl der Patienten mit Geschlechterverteilung, mittleres und medianes Alter je Untersuchungsjahr

Untersuchungsjahr	untersuchte Patienten		männlich	weiblich	mittleres Alter	medianes Alter
2000	32	5,4%	71,9%	28,1%	7,0	3,5
2001	33	5,6%	45,5%	54,5%	9,2	6,0
2002	40	6,8%	52,5%	47,5%	5,6	3,0
2003	47	7,9%	57,4%	42,6%	8,2	5,0
2004	35	6,0%	62,9%	37,1%	5,9	4,0
2005	38	6,5%	50,0%	50,0%	5,2	2,0
2006	50	8,5%	58,0%	42,0%	6,5	4,0
2007	38	6,5%	55,3%	44,7%	3,9	2,5
2008	38	6,5%	73,7%	26,3%	7,4	5,0
2009	35	6,0%	65,7%	34,3%	3,4	3,0
2010	42	7,1%	57,1%	42,9%	7,3	7,0
2011	67	11,4%	65,7%	34,3%	7,0	5,0
2012	93	15,8%	71,0%	29,0%	5,9	4,0

3.1.2 Grad der intellektuellen Beeinträchtigung

Der Grad der intellektuellen Beeinträchtigung wurde bei 89,1% (524/588) der Betroffenen anhand der anamnestischen Leistungsmerkmale geschätzt, 10,9% (64/588) der Betroffenen hatten einen dokumentierten IQ, der mittels eines standardisierten Testverfahrens (beispielsweise Hamburg-Wechsler-Intelligenztest) bestimmt wurde. Alle nachfolgenden Daten beziehen sich, wenn nicht anders erwähnt, auf beide Patientengruppen (mit geschätztem und getestetem IQ). Die Einteilung des Grades der Retardierung erfolgte nach den Vorgaben der Datenbank (sehr leicht, leicht, schwer, sehr schwer). Es zeigte sich, dass knapp die Hälfte der Betroffenen (47,6%, 280/588) eine leichte MR (IQ

50-69) aufwiesen. Knapp ein Viertel aller Betroffenen (24,0%, 141/588) hatten eine sehr leichte MR (IQ 70-85). Weitere 11,6% (68/588) wiesen eine schwere (IQ 20-49) und 1,5% (9/588) eine sehr schwere (IQ<20) MR auf. Die übrigen 15,3% aller Betroffenen (90/588) entfielen auf nicht einschätzbare Patienten. Einerseits handelte es sich bei diesen Patienten um Kinder, die nicht persönlich in der humangenetischen Sprechstunde vorgestellt, sondern lediglich konsiliarisch in der Kinderklinik untersucht wurden. Die Akten waren in diesen Fällen meist unvollständig und somit schlecht auswertbar. Andererseits waren es Kinder, die kurz nach der Geburt phänotypisch auffällig wurden, deren IQ jedoch zu diesem Zeitpunkt aufgrund fehlender standardisierter Intelligenztests in dieser Altersgruppe noch nicht bewertbar war. In allen Gruppen überwog der Anteil der männlichen Betroffenen. Eine genaue Geschlechterverteilung innerhalb der Schweregradgruppen stellt Abbildung 3.2 dar. Der mediane Schweregrad der MR befand sich in der Kategorie der leichten MR (IQ 50-69). Aus Gründen der Vereinfachung und in Anlehnung an die übliche Darstellungsweise in der Literatur wird nachfolgend der Grad der intellektuellen Beeinträchtigung in den beiden Gruppen leicht (IQ>50) und schwer (IQ<50) angegeben.

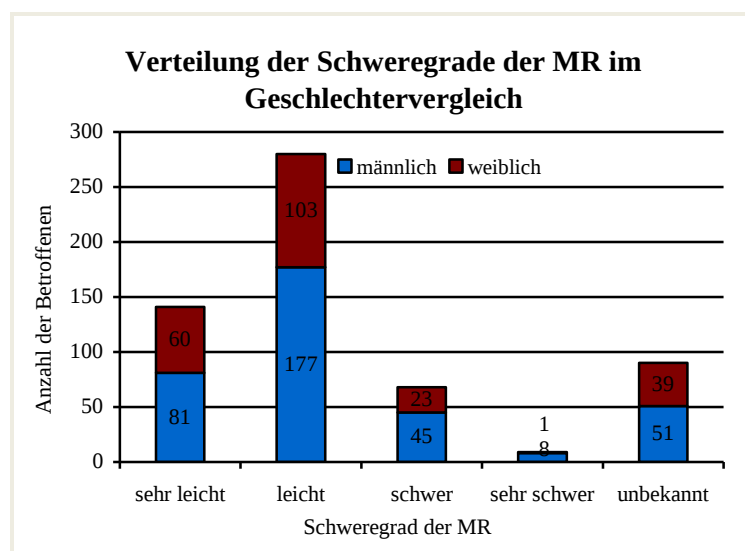


Abbildung 3.2 Verteilung der Schweregrade der MR im Geschlechtervergleich

Die Abbildung spiegelt die Verteilung aller Betroffenen innerhalb der Schweregrade der MR im Geschlechtervergleich wider. 24,0% der Patienten waren sehr leicht (141/588), 47,6% (280/588) leicht, 11,6% (68/588) schwer und 1,5% (9/588) sehr schwer mental retardiert. Der Schweregrad war bei 15,3% der Patienten (90/588) unbekannt.

Bei der differenzierten Betrachtung des Geschlechterverhältnisses und der Altersverteilung in Bezug auf die Schweregradgruppen der MR ergaben sich folgende Ergebnisse. Das Geschlechterverhältnis nahm zugunsten männlicher Betroffener mit dem Schweregrad der MR zu (siehe Tabelle 3.2). Hierbei wurde kein statistisches Signifikanzniveau erreicht ($p=0,249$).

Tabelle 3.2 Geschlechterverhältnis innerhalb der jeweiligen Schweregrade der MR

Schweregrad	Verhältnis männlich:weiblich
leicht	1,6:1
schwer	2,2:1

Bei der differenzierten Betrachtung der Altersverteilung in Bezug auf die Schweregradgruppen der MR (leicht, schwer) ließ sich kein Unterschied ($p=0,311$) innerhalb der Altersgruppen zum jeweiligen Grad der intellektuellen Beeinträchtigung feststellen (siehe Tabelle 3.3). Patienten mit unbekannter MR wurden nicht in die Betrachtung mit einbezogen. Somit waren auswertbare Patienten solche mit leichter und schwerer MR.

Tabelle 3.3 Anteil der Schweregrade der MR innerhalb der Altersgruppen

Altersgruppe (in Jahren)	Anzahl Betroffener	Anzahl auswertbarer Betroffener	Schweregrad			
			leicht		schwer	
<1	106	51	44	86,3%	7	13,7%
1 - <3	102	80	69	86,3%	11	13,7%
3 - <6	155	151	132	87,4%	19	12,6%
6 - <10	94	91	78	85,7%	13	14,3%
10 - <14	52	51	38	74,5%	13	25,5%
14 - <58	79	74	60	81,1%	14	18,9%

3.1.3 Diagnostikmöglichkeiten, Diagnosequote und -spektrum

Die oben von Curry et al. (1997) beschriebenen Empfehlungen waren auch Grundlage der klinisch-genetischen Untersuchung von Patienten mit MR am Institut für Humangenetik der OVGU Magdeburg. Für die meisten vorgestellten Patienten mit MR (ausgenommen einiger konsiliarischer Fälle) lagen eine genaue Anamnese inklusive des Stammbaums und die Dokumentation der klinischen Untersuchung vor. In den meisten Fällen wurden die Patienten nur einmalig von ihren Eltern vorgestellt (87,2% [513/588]). Bei den Patienten, die mindestens ein zweites Mal untersucht wurden (12,8% [75/588]), ist im Vergleich zu den Betroffenen mit einmaliger Vorstellung ein höherer prozentualer Anteil an schweren Retardierungsfällen ($p<0,001$) zu verzeichnen (siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4 Schweregrad der MR entsprechend der Häufigkeit der Vorstellungen

Schweregrad	alle Betroffenen		Betroffene mit einmaliger Vorstellung		Betroffene mit zweiter Vorstellung	
leicht	71,6%	421	73,9%	379	56,0%	42
schwer	13,1%	77	10,7%	55	29,3%	22
unbekannt	15,3%	90	15,4%	79	14,7%	11

Der überwiegende Teil der vorgestellten Personen hatte eine unspezifische MR ohne konkrete Verdachtsdiagnose. Somit erfolgte vor allem die Basisdiagnostik (Karyogramm, Repeatexpansion im *FMR1*-Gen) und es wurden wenige gezielte Diagnostikverfahren (zum Beispiel Methylierungsanalyse des *SNRPN*-Gens, Mutationsanalyse des *UBE3A*-Gens) angewandt. Letztere blieben bei der Auswertung unbeachtet. Insgesamt wurde bei 432 aller Betroffenen (73,5%) ein Karyogramm erstellt. Bei 262 Patienten (44,6%) wurde eine Untersuchung bezüglich einer für das Fragile-X-Syndrom verantwortlichen Repeatexpansion im *FMR1*-Gen und bei 125 Personen (21,3%) eine Mikroarray-

Analyse durchgeführt. Die genaue Jahresverteilung der einzelnen diagnostischen Methoden gibt Abbildung 3.3 wieder. Die Zunahme der Durchführung der Untersuchungsmethoden, insbesondere der Mikroarray-Analysen, begründete sich durch die Verschiebung des diagnostischen Schwerpunktes in Richtung der pädiatrischen Genetik im Rahmen des Wechsels der Institutsleitung.

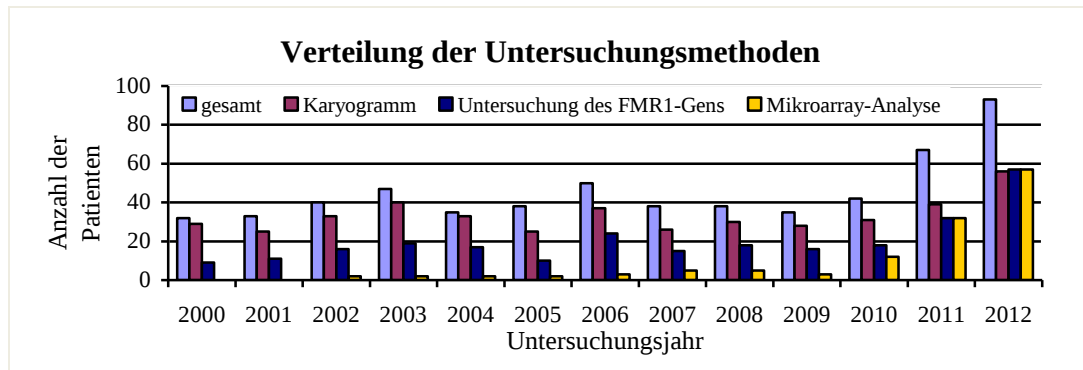


Abbildung 3.3 Verteilung der Untersuchungsmethoden

Das Diagramm zeigt die Anzahl der durchgeführten Karyogramme, Mikroarray-Analysen und Untersuchungen des FMR1-Gens vergleichend zur Gesamtzahl der Vorstellungen pro Untersuchungsjahr. Insgesamt wurden Karyogramme am häufigsten erstellt.

Von allen Patienten konnte bei 26,9% (158/588, davon 62,7% [99/158] männlich, 37,3% [59/158] weiblich) eine genetisch gesicherte Diagnose bezüglich ihrer Entwicklungsverzögerung gestellt werden. Von diesen waren 73,4% (116/158) leicht und 10,1% (16/158) schwer mental retardiert. Die übrigen 16,5% (26/158) hatten eine nicht einschätzbare MR. Bei 70,6% (415/588, davon 61,2% [254/415] männlich, 38,8% [161/415] weiblich) wurde nach dem damals aktuellen Kenntnisstand keine Ursache für ihre MR gefunden. Bei etwa 2,5% der Patienten (15/588, davon 60,0% [9/15] männlich, 40,0% [6/15] weiblich) wurde eine bis dahin unbekannte strukturelle chromosomale Veränderung nachgewiesen, deren Krankheitswert nicht abschließend beurteilbar war. Diese 15 Patienten wurden mittels Mikroarray-Analyse untersucht. Als auffällig wurden acht Deletionen und sieben Duplikationen gewertet. Die genaue Verteilung der Betroffenen mit gesicherter und fraglicher Diagnose innerhalb der einzelnen Untersuchungsjahre stellt Abbildung 3.4 dar.

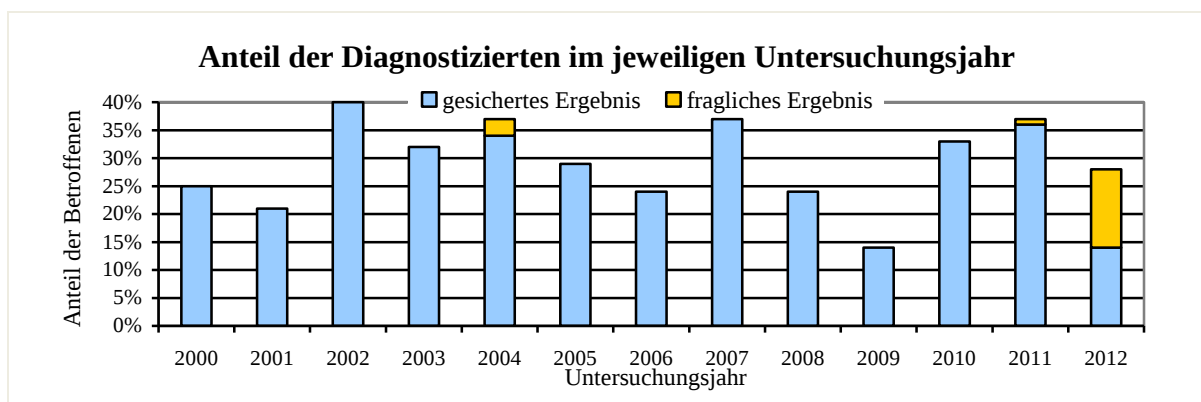


Abbildung 3.4 Anteil der Diagnostizierten im jeweiligen Untersuchungsjahr

Die Abbildung gibt den prozentualen Anteil der Betroffenen, bei denen eine genetisch gesicherte Diagnose bezüglich ihrer Entwicklungsverzögerung gestellt wurde, und den Anteil der Betroffenen mit fraglichem Ergebnis im jeweiligen Untersuchungsjahr wider.

Ausgehend von den genetischen Veränderungen handelte es sich bei den 158 Patienten, bei denen eine Diagnose gestellt werden konnte, in 73 (46,2%) Fällen um strukturelle, in 31 (19,6%) Fällen um numerische Chromosomenanomalien und in 42 (26,6%) Fällen um monogene Veränderungen. Bei den übrigen zwölf (7,6%) Patienten wurden Veränderungen in einer Imprint-Region identifiziert (siehe Abbildung 3.5).

Unter den 31 numerischen Chromosomenveränderungen fanden sich vor allem Trisomien. Am meisten traten die Trisomie 21 (67,7% [21/31]), gefolgt von der Trisomie 18 (6,5% [2/31]) und der Trisomie 13 (3,2% [1/31]) auf. Des Weiteren kamen Fehlverteilungen von Geschlechtschromosomen wie XYY (9,7% [3/31]) oder XXX (6,5% [2/31]) und Mosaik (6,5% [2/31]) vor.

Die häufigsten der 73 strukturellen Chromosomenveränderungen waren Deletionen (53,4% [39/73]). Darunter fanden sich vor allem das Di-George-Syndrom (17,9% [7/39]), weiterhin das Kleeftars-Syndrom (5,1% [2/39]) und mit jeweils einem betroffenen Patienten (2,6% [1/39]) unter anderem das Williams-Beuren-Syndrom, das Trichorhinophalangeale Syndrom, das Katzenschrei-Syndrom und das Rubinstein-Taybi-Syndrom. Als zweithäufigste strukturelle Chromosomenveränderung traten Duplikationen (26,0% [19/73]) auf, gefolgt von Translokationen (13,7% [10/73]). Bei zwei (2,7% [2/73]) Patienten wurde sowohl eine Deletion als auch eine Duplikation gefunden. Die übrigen strukturellen Chromosomenveränderungen (9,6% [7/73]) entfielen auf Inversionen, Triplikationen, Iso- und Markerchromosomen.

Die 42 monogenen Veränderungen wurden überwiegend vom Fragilen-X-Syndrom (35,7% [15/42]) bestimmt, gefolgt vom Noonan-Syndrom (9,5% [4/42]), vom Smith-Lemli-Opitz-Syndrom (7,1% [3/42]) und von Veränderungen im *BRWD3*-Gen (7,1% [3/42]). Weiterhin fanden sich mit jeweils zwei Fällen (4,8% [2/42]) Veränderungen im *KCND1*- und *ATRX*-Gen, sowie das Mowat-Wilson-Syndrom, das Sotos-Syndrom, das Rett-Syndrom und die myotone Dystrophie Typ I. Die fehlenden 11,9% (5/42) verteilten sich auf Krankheitsfälle, die einmalig zu finden waren (CHARGE-Syndrom, Dravet-Syndrom, Johanson-Blizzard-Syndrom, Veränderungen im *EIF2B1*- und *GNAS*-Gen). Einige der seltenen Diagnosen monogener Erkrankungen (Veränderungen im *BRWD3*- und *KCND1*-Gen), die bei mehr als einem Fall beobachtet wurden, enthalten familiäre Beobachtungen (betroffene Geschwister).

Bei 7,6% der Patienten (12/158) wurde eine Veränderung in einer Imprint-Region gefunden. Der überwiegende Teil (66,7% [8/12]) dieser wurde von strukturellen Veränderungen (insbesondere Deletionen) bestimmt, gefolgt von uniparentalen Disomien (33,3% [4/12]). Daraus resultierende Erkrankungen waren mit 58,3% (7/12) das Angelman-Syndrom, mit 25,0% (3/12) das Beckwith-Wiedemann-Syndrom und mit je 8,3% (1/12) das Prader-Willi-Syndrom und das Silver-Russell-Syndrom.

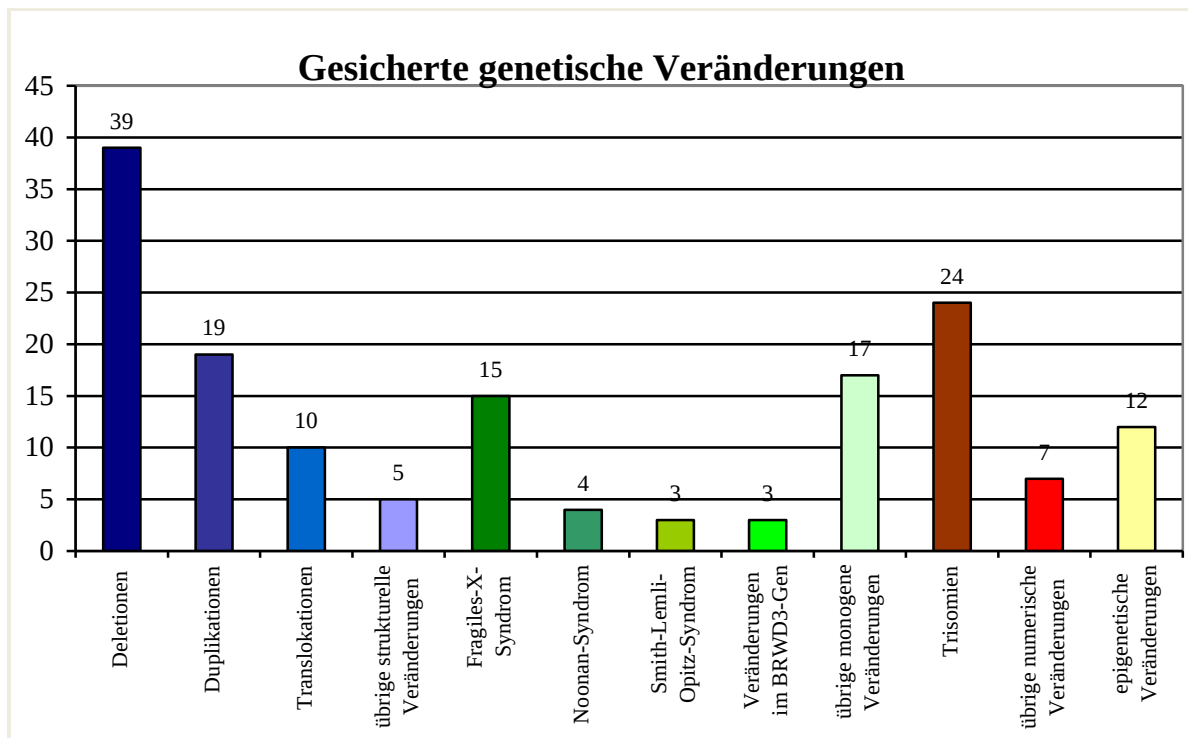


Abbildung 3.5 Gesicherte genetische Veränderungen

Die Abbildung gibt die vier Kategorien der 158 gesicherten genetischen Veränderungen mit den jeweiligen am häufigsten auftretenden Beispielen wider. In blau sind die 73 strukturellen, in grün die 42 monogenen, in rot die 31 numerischen und in gelb die 12 epigenetischen Veränderungen dargestellt.

3.1.4 Einflüsse in der Schwangerschaft

Bei acht Betroffenen (1,4%) der Magdeburger Kohorte ließ sich der Verdacht auf eine Infektionskrankheit (Toxoplasmose, Varizellen, Cytomegalievirus-Infektion) in der Schwangerschaft eruieren. Zudem wurden Genussmittel betrachtet, die während der Schwangerschaft konsumiert wurden. Bei 3,6% (21/588) aller Patienten der hier untersuchten Kohorte wurde ein Alkoholkonsum und bei 6,3% (37/588) ein Zigarettenkonsum in der Schwangerschaft dokumentiert. In fünf Fällen wurden beide Genussmittel konsumiert. Es war bei beiden Konsumgütern sowohl ein Überwiegen im männlichen Geschlecht als auch in der Gruppe der leichten MR zu verzeichnen (siehe Tabelle 3.5). Weiterhin wurde bei neun Betroffenen (1,5%) der Kohorte die regelmäßige Einnahme von Medikamenten (Antiepileptika, Antidepressiva, Analgetika, Antihypertensiva) während der Schwangerschaft beschrieben. Weitere sechs Frauen (1,0%) gaben einen Drogenkonsum während der Schwangerschaft an.

Tabelle 3.5 Verteilung von Alkohol- und Zigarettenkonsum in der Schwangerschaft Betroffenen auf die Schweregrade der MR im Geschlechtervergleich

Schwere- grad	Alkohol			Zigaretten		
	gesamt	männlich	weiblich	gesamt	männlich	weiblich
leicht	15	11	4	26	20	6
schwer	2	2	0	6	5	1
unbekannt	4	2	2	5	2	3

Bei der Suche nach den in der Einführung beschriebenen für die FASD charakteristischen morphologischen Auffälligkeiten in der Datenbank zeigte sich, dass bei allen Merkmalen der Anteil bei Betroffenen mit Alkoholkonsum in der Schwangerschaft im Vergleich zur Kohorte ohne Alkoholkonsum überwog (siehe Abbildung 3.6). Bei den Merkmalen Mikrozephalus ($p<0,05$), reduziertes Geburtsgewicht ($p<0,001$), Verhaltensauffälligkeiten ($p<0,05$) und verstrichenes Philtrum ($p<0,05$) wurde hierbei eine statistische Signifikanz erreicht.

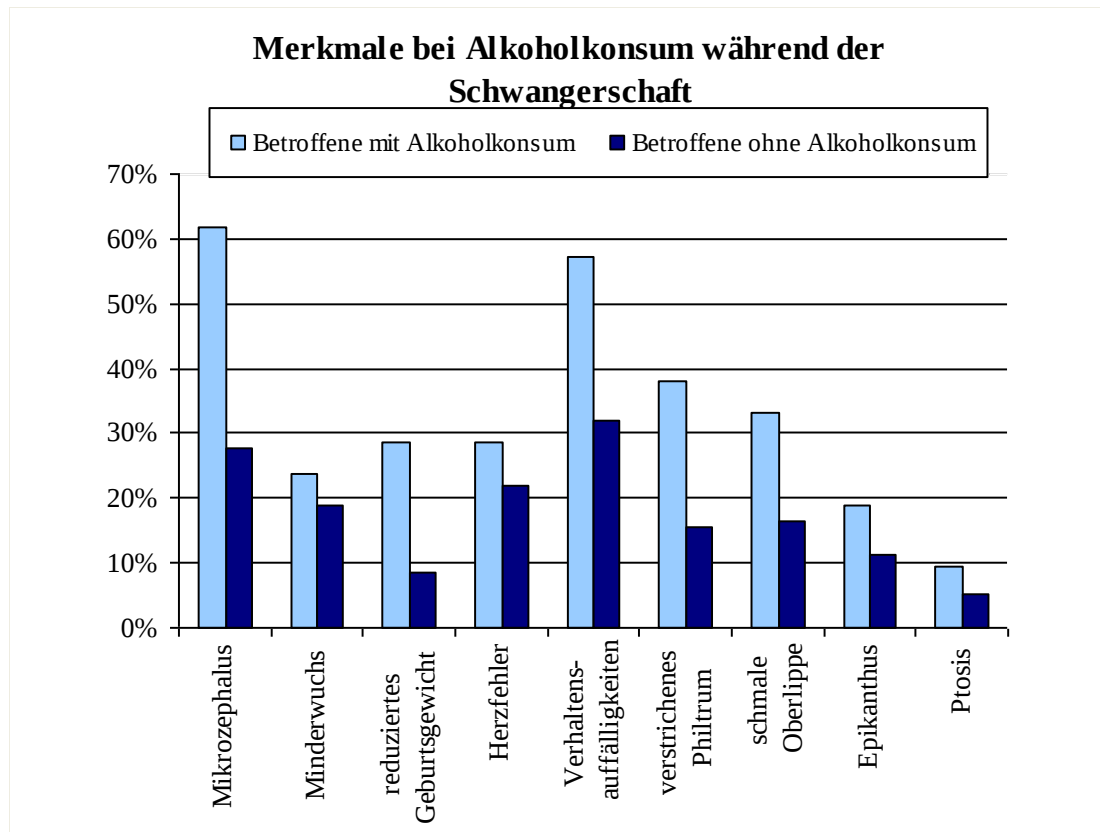


Abbildung 3.6 Merkmale bei Alkoholkonsum während der Schwangerschaft

Das Diagramm stellt den prozentualen Anteil der Merkmale aller Betroffener unserer Kohorte mit bekanntem Alkoholkonsum der Mutter während der Schwangerschaft (hellblau) verglichen mit dem Vorkommen in der Kohorte ohne Alkoholkonsum (dunkelblau) dar. Insgesamt wurde bei 3,6% der Betroffenen (21/588) ein Alkoholkonsum der Mutter während der Schwangerschaft eruiert.

3.1.5 Komorbiditäten

Von allen Untersuchten in der Magdeburger Kohorte zeigten 33,0% (194/588) eine oder mehrere Verhaltensauffälligkeiten. Von diesen waren 71,1% (138/194) männlich und 28,9% (56/194) weiblich. Zu den häufigsten Verhaltensauffälligkeiten zählten die Aggressivität/Impulsivität (66/588) und die Hyperaktivität (52/588). Die verschiedenen Auffälligkeiten und deren Anteil an männlichen bzw. weiblichen Betroffenen in Bezug auf die Schweregradgruppen der MR stellt Tabelle 3.6 dar. Es war bei allen Verhaltensauffälligkeiten sowohl ein Überwiegen im männlichen Geschlecht als auch in der Gruppe der leichten MR zu erkennen. Seltene Verhaltensauffälligkeiten wie Ticstörungen oder Bruxismus traten nur in wenigen Fällen auf und finden in der Tabelle keine Beachtung.

Tabelle 3.6 Verhaltensauffälligkeiten innerhalb der Schweregradgruppen bei beiden Geschlechtern

Verhaltensauffälligkeit	Anzahl der Betroffenen	Schweregrad der MR					
		leicht		schwer		unbekannt	
		m	w	m	w	m	w
Aggressivität/Impulsivität	66	44	13	5	4	0	0
Hyperaktivität	52	37	7	5	3	0	0
autistisches Verhalten	33	16	6	8	3	0	0
Schlafstörungen	32	18	6	4	3	1	0
kurze Aufmerksamkeitsspanne	27	12	9	5	1	0	0
Stereotypien	23	10	5	6	2	0	0

Die Auswertung bestimmter häufiger mit MR assoziierter Merkmale bzw. Merkmalskombinationen ergab folgende Ergebnisse (siehe Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7 Merkmale und Merkmalskombination aufgeteilt in Schweregrade der MR und Geschlecht

Merkmal	gesamt	Schweregrad der MR					
		leicht		schwer		unbekannt	
		m	w	m	w	m	w
Epilepsie	104	38	16	27	13	7	3
Epilepsie + Mikrozephalus	28	4	2	13	6	3	0
Epilepsie + Makrozephalus	6	4	1	1	0	0	0
Mikrozephalus	171	60	42	25	14	17	13
Mikrozephalus Gruppe 1	94	37	24	9	8	11	5
Mikrozephalus Gruppe 2	77	23	18	16	6	6	8
Mikrozephalus + Ventrikelerweiterung	16	3	1	6	5	1	0
Makrozephalus	36	13	18	2	1	1	1
Makrozephalus + Ventrikelerweiterung	7	2	1	2	0	1	1
reduziertes Geburtsgewicht	55	16	18	8	4	3	6
reduziertes Geburtsgewicht + Nikotin	11	6	1	3	1	0	0
reduziertes Geburtsgewicht + Alkohol	6	3	1	1	1	0	0
erhöhtes Geburtsgewicht	6	3	1	0	0	0	2

Insgesamt litten 104 Personen (17,7%) unter Krampfanfällen. Unter diesen befanden sich 51,9% (54/104) mit einer leichten und 38,5% (40/104) mit einer schweren MR. Im Vergleich zur Kohorte ohne Epilepsie (leichte MR 75,8% [367/484], schwere MR 7,6% [37/484]) war der Anteil an schwer Retardierten in der Gruppe der Epileptiker erhöht. Die Zunahme des Anteils der schweren MR bei

Epileptikern im Vergleich zur Kohorte ohne Epilepsie erreichte einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$). Von allen Epileptikern hatten 26,9% (28/104) einen unterdurchschnittlichen und 5,8% (6/104) einen überdurchschnittlichen Kopfumfang. In der Kohorte waren 29,1% (171/588) zum Zeitpunkt der Vorstellung und 3,9% (23/588) zur Geburt mikrozephal. Es hatten jedoch nur neun Patienten sowohl zur Geburt als auch zum Zeitpunkt der Vorstellung einen zu kleinen Kopfumfang. Das heißt 14 Patienten waren bei der Vorstellung im humangenetischen Institut normozephal, trotz des zur Geburt festgestellten Mikrozephalus. 6,1% (36/588) der Kohorte wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchung einen überdurchschnittlichen Kopfumfang auf. Bei 0,3% (2/588) der Personen konnte anamnestisch ein Makrozephalus zum Zeitpunkt der Geburt festgestellt werden. Der Kopfumfang dieser zwei Patienten war bei der Vorstellung im humangenetischen Institut im Normbereich. Eine Erweiterung der Hirnventrikel hatten 19,4% (7/36) der makrozephalen und 9,4% (16/171) der mikrozephalen Betroffenen. Von den Makrozephalen ohne Ventrikelerweiterung hatten 96,6% (28/29) eine leichte und 3,4% (1/28) eine schwere MR, wohingegen es bei den Makrozephalen mit Ventrikelerweiterung 42,9% (3/7) mit einer leichten und 28,6% (2/7) mit einer schweren MR waren. Bei der vergleichenden Betrachtung der Schweregradgruppe der MR mit dem Merkmal Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer Ventrikelerweiterung ergab sich nur in der Tendenz ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,05$). Zusätzlich zum Mikrozephalus hatten 4,7% (8/171) eine Hirnatrophie und 20,5% (35/171) allgemeine Auffälligkeiten in der Bildgebung. Die Patienten mit Mikrozephalus wurden für den Literaturvergleich in zwei Gruppen unterteilt, eine mit einem Kopfumfang von -2 SD bis $-2,99$ SD (Gruppe 1, $n = 94$) und die zweite mit Werten unter -3 SD (Gruppe 2, $n = 77$). Von den acht Patienten der eigenen Kohorte mit Mikrozephalus, bei denen radiologisch eine Hirnatrophie festzustellen war, konnten drei der ersten Kopfumfangsgruppe und fünf der zweiten zugeteilt werden. Hierbei wurde im Vergleich zu den Betroffenen der jeweiligen Kopfumfangsgruppe ohne Hirnatrophie kein statistisches Signifikanzniveau erreicht ($p = 0,470$). Die 9,4% (16/171) der Mikrozephalen mit radiologisch festgestellter Hirnventrikelerweiterung ließen sich gleichmäßig auf beide Kopfumfangsgruppen aufteilen. Hier wurde ebenfalls im Vergleich zu den Betroffenen der jeweiligen Kopfumfangsgruppe ohne Ventrikelerweiterung kein statistisches Signifikanzniveau erreicht ($p = 0,793$). In Gruppe 1 hatten 64,9% (61/94) der Betroffenen eine leichte MR und 18,1% (17/94) eine schwere MR, während es in Gruppe 2 53,2% (41/77) mit einer leichten und 28,6% (22/77) mit einer schweren MR waren. Bei der vergleichenden Betrachtung der Kopfumfangsgruppen in Bezug auf die Schweregradgruppen der MR wurde kein statistisch signifikantes Ergebnis erreicht ($p = 0,092$). Bei Geburt hatten 9,4% (55/588) der Kohorte ein zu niedriges und 1,0% (6/588) ein zu hohes Gewicht (unter bzw. über 2 SD). Von denen mit einem reduzierten Geburtsgewicht war bei 20,0% (11/55) ein Zigarettenkonsum und bei 10,9% (6/55) ein Alkoholkonsum während der Schwangerschaft zu beobachten. Von den 588 betroffenen Personen hatten 62,2% (366/588) eine nicht-syndromale, 37,8% (222/588) eine syndromale MR. Die

syndromalen Fälle der MR wurden anhand relevanter Fehlbildungen und angeborener Erkrankungen klassifiziert. Dazu gehörten Organfehlbildungen (intestinale Malrotation, Anal-, Duodenal-, und Ösophagusatresie, enger Gehörgang, Kolobome an Iris, Retina und Sehnerv, Spaltbildungen in der Mundregion, Herz- und Nierenfehlbildungen) oder körperliche Auffälligkeiten wie ein Groß- oder Kleinwuchs, Mikro-, Makro- oder Brachyzephalie, Kraniosynostosen, Hand- und Fußfehlbildungen (Polydaktylie, Brachydaktylie). Daneben zeigten einige Betroffene Krampfanfälle, Veränderungen im Elektroenzephalogramm (EEG), Blindheit, Taubheit oder neuroradiologische Auffälligkeiten.

3.2 Untersuchungsergebnisse bei ausgewählten Patienten

Bei der Auswertung der Datenbank wurde besonders auf familiäre Fälle einer MR mit Mendel'schem Vererbungsmuster geachtet, da weitere Analysen zur Aufklärung der zugrunde liegenden Ursachen durch neue molekulargenetische Techniken in solchen Familien besonders aussichtsreich sind. So konnten zwei Familien (Familie A, Familie C) gefunden werden, bei denen aufgrund des Stammbaums der Verdacht auf eine XLMR gestellt wurde. Bei diesen Familien wurde eine Exom-Analyse des X-Chromosoms mittels NGS durch Kooperationspartner in Utrecht (Departement of Medical Genetics, University Medical Center Utrecht, Utrecht, Niederlande) durchgeführt. Familie B stellte sich in der Sprechstunde vor und wurde aufgrund morphologischer Auffälligkeiten direkt bezüglich Veränderungen im *BRWD3*-Gen untersucht. Weiterhin fiel die Familie D, bei der sowohl die Eltern als auch die 5 Kinder eine MR aufwiesen, bei der Auswertung der Datenbank auf. Nach Identifizierung zweier genetischer Veränderungen des Index-Patienten mittels Mikroarray-Analyse, wurden die übrigen Familienmitglieder mithilfe der MLPA untersucht.

3.2.1 Familie A

3.2.1.1 Klinische Daten

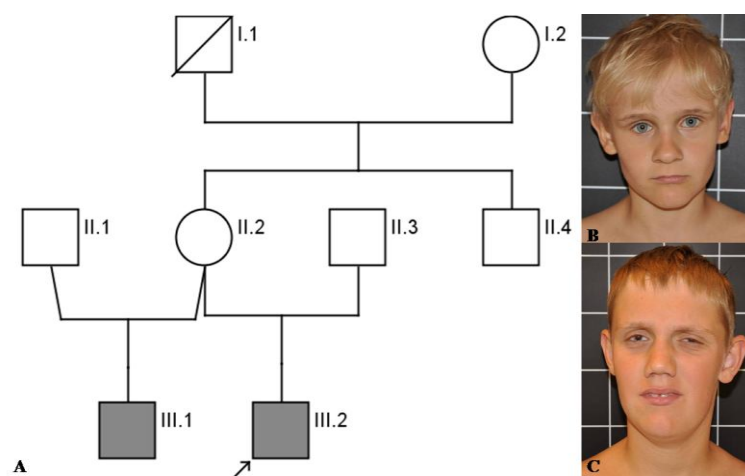


Abbildung 3.7 A: Stammbaum der Familie A; B und C: Fotos der Patienten

A: Der Pfeil zeigt auf den Indexpatienten, grau hinterlegte Felder markieren betroffene Familienmitglieder. B: Frontalaufnahme des Indexpatienten III.2. C: Frontalaufnahme des Halbbruders III.1.

Nach einer unauffälligen Schwangerschaft wurde der Indexpatient (III.2) zeitgerecht mit normalen Körpermaßen (Kopfumfang 35 cm, Gewicht 3.315 g, Größe 54 cm) geboren. Die postnatale Periode gestaltete sich bis auf einen Neugeborenenikterus und einer Kuhmilchproteinallergie unauffällig. Im Alter von 13 Monaten fiel erstmals eine Entwicklungsverzögerung, vor allem im sprachlichen Bereich, auf. Logopädische Behandlungen und Förderunterricht im Kindergarten erbrachten wenig Fortschritte, woraufhin der 7-jährige Junge im Institut für Humangenetik an der OVGU Magdeburg vorgestellt wurde. Die klinische Untersuchung ergab einen verringerten Muskeltonus, folgende Körpermaße (Größe: 130,5 cm [75. Perzentile], Gewicht: 29,8 kg [85. Perzentile], Kopfumfang: 56 cm [>97. Perzentile], Angabe der Perzentilen nach (Neuhauser et al. 2013), eine gering ausgeprägte Skoliose und einen Kryptorchismus. Phänotypische Auffälligkeiten waren eine hohe fliehende Stirn, tiefsitzende Augen, ein breiter und hoher Nasenrücken, weit auseinander stehende Mamillen, breite Finger, eingeschlagene Daumen, eine Vierfingerfurche beidseits, überstreckbare Fingergelenke und breite Zehen. Sein Sprachverständnis schien gut zu sein, sprachliche Äußerungen waren jedoch schwer verständlich. Insgesamt wurde seine Entwicklungsverzögerung als leicht eingeschätzt (Zhang et al. 2005). Die Mutter des Indexpatienten berichtete über häufig wiederkehrende Sturzanfälle und eine ausgeprägte Enuresis. Verhaltensauffälligkeiten wurden verneint. Weitere Untersuchungen ergaben ein pathologisches EEG mit Verdacht auf eine Hirnfunktionsstörung im parieto-occipito-temporalen Bereich links. Eine Schädel-Magnetresonanztomografie zeigte mild erweiterte Ventrikel und eine Vergrößerung der Hirnoberfläche. Im Alter von 8 ⁸/₁₂ Jahren wurde eine Epilepsie diagnostiziert, die im Folgenden medikamentös eingestellt wurde. Die genetische Diagnostik bezüglich einer chromosomalen Veränderung mittels konventioneller Chromosomenanalyse, die Mikroarray-Analyse sowie die molekulargenetische Diagnostik bezüglich eines Fragilen-X-Syndroms ergaben unauffällige Befunde.

Der drei Jahre ältere Halbbruder (III.1) wurde ebenfalls nach unauffälliger Schwangerschaft mit normalen Geburtsmaßen (Gewicht: 4.035 g, Größe: 54 cm, Kopfumfang: 37 cm) geboren. Während seiner Kindheit fielen häufige Infektionen und regelmäßige Kopfschmerzen auf. Im Alter von 10 ⁶/₁₂ Jahren wurde er aufgrund einer sprachlichen Entwicklungsverzögerung und Verhaltensauffälligkeiten wie Hyperaktivität und Aggressivität in der genetischen Sprechstunde vorgestellt. Die klinische Untersuchung ergab auffällige Körpermaße (Größe: 158,5 cm [> 97. Perzentile], Gewicht: 50 kg [> 90. Perzentile], Kopfumfang: 58 cm [>97. Perzentile]), einen verringerten Muskeltonus und eine Trichterbrust. Er zeigte phänotypische Ähnlichkeiten zu seinem Bruder wie die hohe fliehende Stirn, die tiefsitzenden Augen, die breiten Finger, die eingeschlagenen Daumen, die Vierfingerfurche beidseits, die überstreckbaren Gelenke und die breiten Zehen. Zusätzlich hatte er große Ohren und invertierte Mamillen. Ein Kryptorchismus lag nicht vor. Seine sprachliche Entwicklungsverzögerung war weniger ausgeprägt als die seines Halbbruders. Sein getesteter IQ war 54 und somit wurde er in die Gruppe der leichten MR eingeordnet (Zhang et al. 2005). Aufgrund eines pathologischen EEG's

und der Tatsache, dass sein Bruder unter Epilepsie leidet, wurde er medikamentös antiepileptisch eingestellt. Sowohl molekulargenetische Tests auf das Fragile-X-Syndrom, das Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom und die Mikroarray-Analyse als auch das Karyogramm ergaben unauffällige Ergebnisse.

Aufgrund ähnlicher Krankheitsbilder der beiden Halbbrüder mit gemeinsamer Mutter wurde bei Familie A der Verdacht auf eine XLMR geäußert (siehe Abbildung 3.7, A-C). Die grafische Darstellung der Stammbäume in dieser Arbeit erfolgte mithilfe des Center for Genomics and Transcriptomics (siehe Tabelle A.26). Die Mutter (II.2) und der Onkel (II.4) mütterlicherseits sowie die Väter (II.1, II.3) der beschriebenen Jungen waren klinisch unauffällig. Die Großmutter (I.2) wies sehr leichte mentale Auffälligkeiten und geringe Gesichtsdysmorphien auf.

3.2.1.2 Ergebnisse der genetischen Diagnostik

Bei dem Indexpatienten (III.2) der Familie A ergab das in Utrecht durchgeführte NGS der kodierenden Bereiche des X-Chromosoms einen Basenaustausch im Exon 8 des *BRWD3*-Gens (c.712G>C). Hierbei handelt es sich um eine Missense-Mutation, bei der die hochkonservierte Aminosäure Alanin gegen Prolin ausgetauscht wird (p.A238P). Zur Bestätigung des Ergebnisses wurde nach PCR und Gelelektrophorese eine Sequenzierung des Exons 8 nach Sanger durchgeführt (siehe Abbildung 3.8, B und C). Es konnte der vermutete X-chromosomale Erbgang mit Überträgerseigenschaft der Mutter (II.2) bestätigt werden. Deshalb wurde ebenfalls die Großmutter mütterlicherseits (I.2) und, zum Ausschluss des Vorliegens einer nicht-krankheitsverursachenden Veränderung, der gesunde Bruder der Mutter (II.4) untersucht. Es ergab sich folgender Stammbaum (siehe Abbildung 3.8, A). Der Indexpatient (III.2) und sein Halbbruder (III.1) trugen die Mutation im *BRWD3*-Gen hemizygot, die Mutter (II.2) und die Großmutter (I.2) waren heterozygote Konduktorinnen. Beim gesunden Onkel (II.4) des Indexpatienten konnte die Mutation nicht nachgewiesen werden. Sowohl bei der Mutter (II.2) als auch bei der Großmutter (I.2) wurde zusätzlich im diagnostischen Routinelabor des Instituts für Humangenetik am Universitätsklinikum Magdeburg die XCI untersucht. Die zur Verfügung gestellten Ergebnisse ergaben bei der Mutter eine eindeutig präferentielle XCI (98:2), bei der Großmutter ein nicht signifikant verschobenes Verhältnis (76:24).

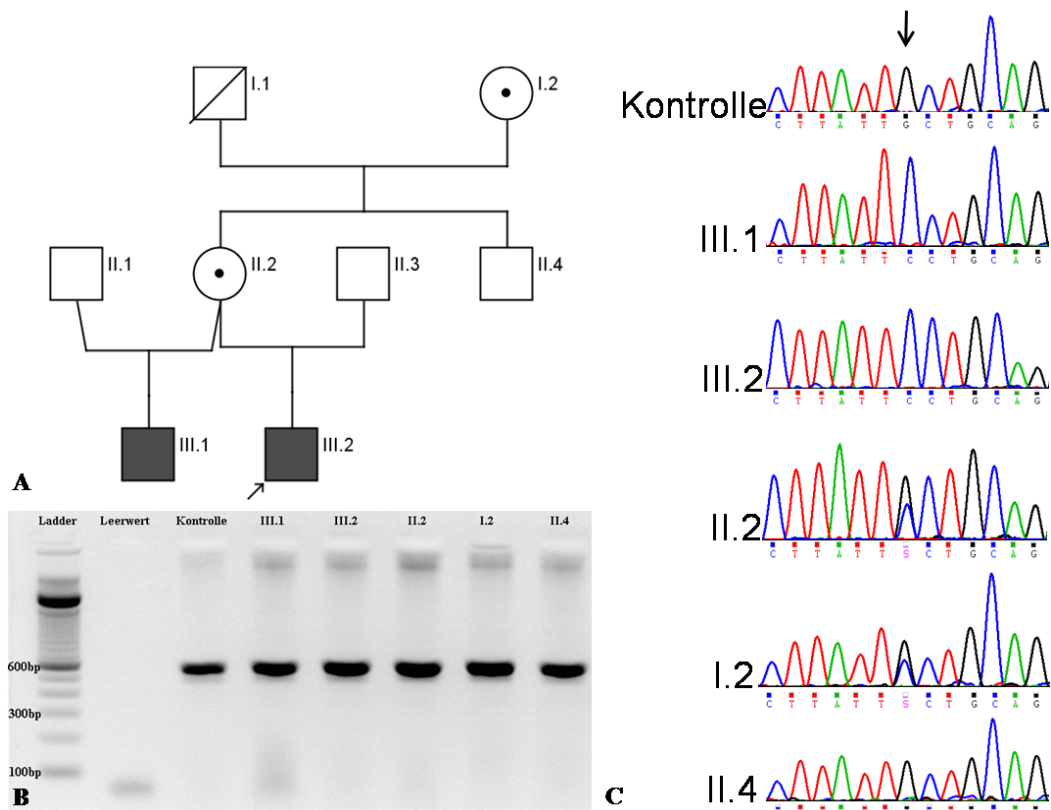


Abbildung 3.8 A: Stammbaum der Familie A; **B:** Gelelektrophoresebild (2%iges Agarosegel) nach PCR der Familie A; **C:** Sequenzen vom Exon 8 (Position 706-718) der Familie A

A: Der Pfeil zeigt auf den Indexpatienten, grau hinterlegte Felder markieren betroffene Familienmitglieder, der Punkt markiert Konduktorinnen. **B:** Nach erfolgreicher PCR-Amplifikation zeigte sich im 2%igen Agarosegel bei allen Patienten das erwartete Fragment mit einer Länge von 557 bp. **C:** Der Pfeil markiert die Position 712 im Exon 8, bei der es bei den Patienten III.1 und III.2 zum Austausch der Base G gegen C kam. Die Patienten II.2 und I.2 tragen beide Allele, die Kontrolle und der Patient II.4 den Wildtypen mit der Base G.

3.2.2 Familie B

3.2.2.1 Klinische Daten

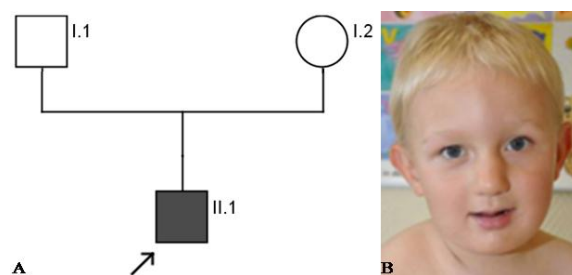


Abbildung 3.9 A: Stammbaum der Familie B; **B:** Foto des Indexpatienten

A: Der Pfeil zeigt auf den Indexpatienten, grau hinterlegte Felder markieren betroffene Familienmitglieder. **B:** Frontalaufnahme des Indexpatienten II.1.

Der Indexpatient der Familie B (siehe Abbildung 3.9, B) wurde mit normalen Körpermaßen nach einer unauffälligen Schwangerschaft geboren. Die postnatale Periode gestaltete sich aufgrund von Ernährungsproblemen, einem schwachen Muskeltonus und einem Ventrikelseptumdefekt schwierig. Der Junge lernte mit 24 Monaten Laufen. Als er 2^{10/12}-jährig in der humangenetischen Sprechstunde

vorgestellt wurde, wies er wenig aktive Sprache auf. Insgesamt wurde seine Entwicklungsverzögerung als leicht eingeschätzt (Zhang et al. 2005). Weiterhin fielen Körpermaße über der 97. Perzentile (Größe: 107,5 cm, Gewicht: 20 kg, Kopfumfang: 53 cm) und Verhaltensauffälligkeiten wie Hyperaktivität und Aggressivität auf. Phänotypische Charakteristika waren eine hohe fliehende Stirn, eine prominente Sutura metopica und invertierte Mamillen. Molekulargenetische Tests (Fragiles-X-Syndrom, Mikroarray-Analyse) und das Karyogramm waren unauffällig. Der Vater I.1 war klinisch unauffällig, während die Mutter I.2 eine geringe intellektuelle Beeinträchtigung im Grad einer Lernbehinderung aufwies. Den Stammbaum der Familie B stellt Abbildung 3.9, A dar.

3.2.2.2 Ergebnisse der genetischen Diagnostik

Aufgrund der klinischen Symptome des Patienten erfolgte direkt eine molekulargenetische Diagnostik des *BRWD3*-Gens. Dabei fiel auf, dass sich die PCR-Fragmente für die Exons 34 und 35 wiederholt nicht amplifizieren ließen. Eine mögliche Deletion dieser Exons sollte mithilfe verschiedener Methoden verifiziert und eine Übertragereigenschaft der Mutter (I.2) aufgeklärt werden. Als erstes wurde eine Multiplex-PCR für die Fragmente der Exons 4, 24, 27, 32-33, 34 und 35 durchgeführt. Während die PCR-Fragmente für die Exons 4, 24, 27 und 32-33 beim Patienten und bei den Kontrollen erfolgreich amplifiziert werden konnten, waren nur beim Indexpatienten (II.1) keine Produkte für die Exons 34 und 35 nachweisbar. Die beiden fehlenden Banden in der Gelelektrophorese beim Indexpatienten bestätigten den Verdacht der Deletion der Exons 34 und 35 (siehe Abbildung 3.10).

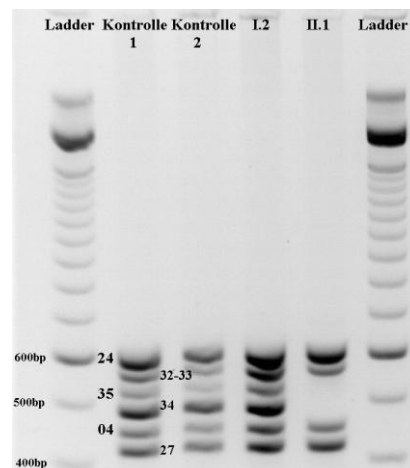


Abbildung 3.10 Gelelektrophoresebild (2,5%iges Agarosegel) nach Multiplex-PCR

Die Kontroll-DNA-Proben zeigen, dass die simultane Amplifizierung aller Exons möglich war. Beim Indexpatienten (II.1) sind die Banden für die PCR-Produkte der Exons 34 und 35 nicht nachweisbar. Das Gelelektrophoresebild bei der Mutter (I.2) mit nachweisbaren Banden der Exons 34 und 35 lässt keine sichere Einschätzung hinsichtlich eines Konduktorinnenstatus zu.

Mit dieser Methode konnte zwar durch das Vorhandensein aller sechs Banden bei der Mutter (I.2) eine homozygote Deletion ausgeschlossen, jedoch die mögliche Übertragereigenschaft nicht geklärt werden. Zur weiteren Analyse wurde eine Long-Range-PCR mit dem Ziel, das die Deletion

überspannende DNA-Fragment nachzuweisen, durchgeführt. Bei der Long-Range-PCR wurden der Vorwärts-Primer 32-33 und der Rückwärts-Primer 35 (siehe Tabelle A.9) benutzt. Außerdem wurde, um ein Mosaik bei der Mutter auszuschließen, sowohl ihre DNA aus Blut als auch aus Speichel verwendet. Die Banden der Kontroll-DNAs spiegeln die Länge der entstandenen Fragmente beim Wildtyp wieder (3.449 bp). Das Fragment des Indexpatienten war durch die Deletion der Exons 34 und 35 verkürzt und dadurch in der Gelelektrophorese weiter gewandert (siehe Abbildung 3.11, A). Bei der Mutter konnte anhand der zwei entstandenen Banden gezeigt werden, dass sie sowohl ein nicht deletiertes als auch ein deletiertes Allel trägt. Dadurch konnte bewiesen werden, dass sie Konduktorin ist und es ergab sich folgender Stammbaum (siehe Abbildung 3.11, B). Ein dringender Hinweis für ein Mosaik konnte hier nicht festgestellt werden, da das Deletionsfragment in beiden untersuchten Materialien in etwa gleicher Stärke wie das Normalfragment nachweisbar war.

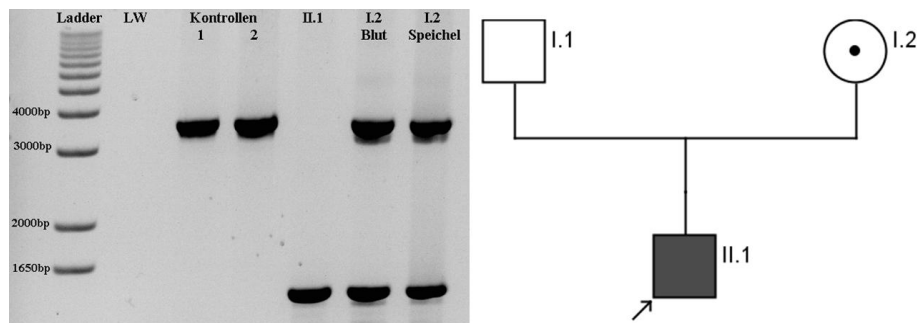


Abbildung 3.11 A: Gelelektrophoresebild (1%iges Agarosegel) nach Long-Range-PCR; B: Stammbaum der Familie B

A: Die zwei Banden bei den Proben der Mutter verdeutlichen, dass sie die Mutation heterozygot trägt und damit Konduktorin ist. Die Länge des Wildtypfragments beträgt 3.449 bp, die des deletierten Alleles weniger als 1.650 bp und mehr als 1.000 bp. **B:** Der Pfeil zeigt auf den Indexpatienten, grau hinterlegte Felder markieren betroffene Familienmitglieder, der Punkt markiert Konduktorinnen.

Zur Absicherung der Ergebnisse und zur Klärung, ob durch den Verlust der Exons 34 und 35 trotzdem eine stabile RNA entsteht und welche Konsequenz die Deletion auf die mRNA-Sequenz hat, wurde eine PCR an cDNA durchgeführt. Dafür wurden cDNA-Abschnitte, die die Exons 9-14 und die Exons 32-37 umfassen, amplifiziert (siehe Abbildung 3.12).

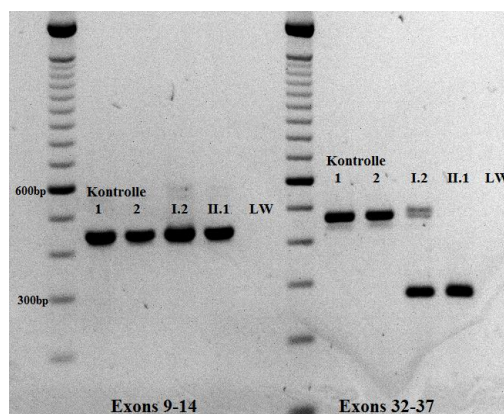


Abbildung 3.12 Gelelektrophoresebild (2%iges Agarosegel) nach PCR mit cDNA

Die entstandenen Banden bei Exon 9-14 beweisen, dass trotz Deletion eine RNA entsteht. Diese ist, erkenntlich durch die verschiedenen Banden bei Exon 32-37, um etwa 200 bp verkürzt.

Das Vorhandensein der Banden für das cDNA-Fragment, das die Exons 9-14 umfasste, in vergleichbarer Stärke wie bei den Kontrollen, ließ darauf schließen, dass eine Deletion der Exons 34 und 35 keinen Einfluss auf die Stabilität der mutierten RNA hatte. Des Weiteren bewiesen die Banden für das Fragment der Exons 32-37 die Entstehung einer verkürzten mRNA. Die zwei Banden bei der Mutter belegten, dass zwei Allele, mit und ohne Mutation, vorlagen. Die Fragmentgröße der verkürzten cDNA lag etwa 200 bp unter dem Normalallel, was der Größe der Exons 34 und 35 entsprechen würde. Zur endgültigen Identifizierung der Bruchpunkte der Deletion wurde eine bruchpunktüberspannende Sequenzierung durchgeführt. Die DNA beider einzelnen Allele der Mutter wurde durch Gelextraktion der Long-Range-PCR- und der cDNA-PCR-Produkte gewonnen. Anstatt der üblichen 0,5 µl des aufgereinigten PCR-Produkts wurden für die Sequenzierreaktion 0,8 µl des Long-Range-PCR-Produkts und 1,5 µl des cDNA-PCR-Produkts verwendet. Die Sequenzierung zeigte auf genomischer Ebene eine 2.017 bp große Deletion, die das komplette Exon 34 und nahezu das gesamte Exon 35 (das letzte Basenpaar ist erhalten) umfasste (g.79,942,362_79,944,379del). Auf cDNA-Ebene wurde das Fehlen von genau 197 Basen von Exon 34 und 35 bestätigt (c.3808_4005del). Die Abbildung 3.13 stellt die Ergebnisse der Sequenzierung dar. Es handelte sich um eine In-Frame-Deletion. Das heißt das Leseraster blieb erhalten, aber durch die deletierten Aminosäuren entstand vermutlich ein verändertes Protein (p.D1270_P1335del).

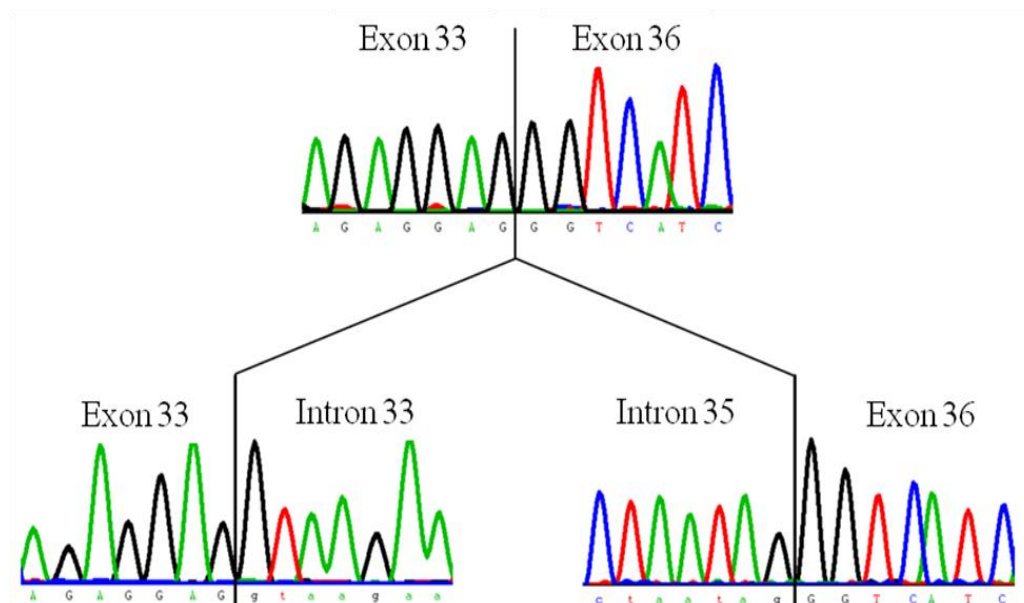


Abbildung 3.13 Sequenzierungsergebnisse auf cDNA-Ebene

Die Abbildung stellt die Sequenzierungsergebnisse des Indexpatienten (II.1) der Familie B auf cDNA-Ebene vergleichend zur Sequenz des Wildtypen dar. Die obere Reihe spiegelt den Verlust der Exons 34 und 35 beim Indexpatienten wider. Die untere Reihe verdeutlicht an welcher Stelle der Bruchpunkt zu finden ist.

3.2.3 Familie C

3.2.3.1 Klinische Daten

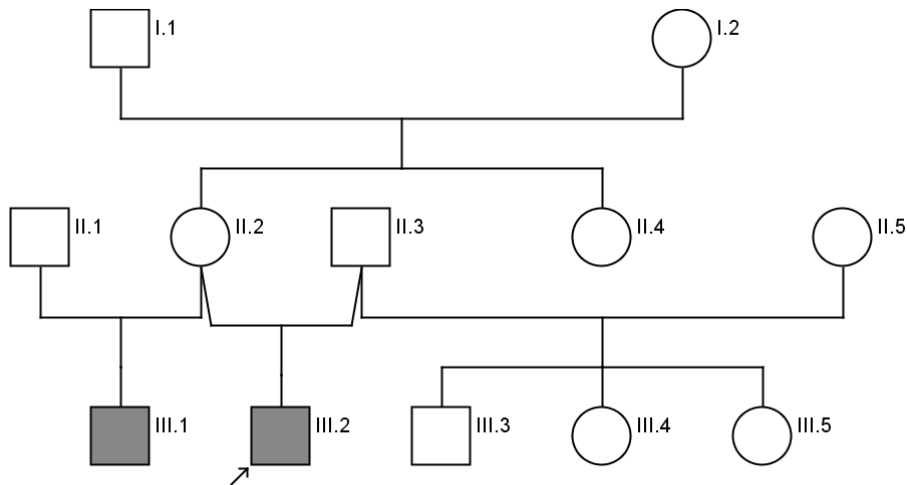


Abbildung 3.14 Stammbaum der Familie C

Der Pfeil zeigt auf den Indexpatienten, grau hinterlegte Felder markieren betroffene Familienmitglieder.

Der Indexpatient (III.2) wurde in der 40. Schwangerschaftswoche mit einem Gewicht von 3.450 g und einer Größe von 49 cm spontan geboren. Bei Erstvorstellung im Alter von 4 Jahren sprach er wenig und zeigte autistische Züge. Er kommunizierte vor allem über die Aneinanderreihung von Silben und Lauten. Mit 6 Monaten konnte er sitzen und mit 12 Monaten laufen. Da die motorische Entwicklung normal verlief, wurde der Junge als leicht mental retardiert eingestuft (Zhang et al. 2005). Er besuchte einen integrativen Kindergarten. Phänotypisch auffällig waren die prominente Stirn, die gerade Lidspalte und die großen Ohren.

Der ältere Bruder (III.1) zeigte ebenfalls eine MR mit Autismus und Sprachstörungen. 11-jährig wurde der Junge erstmals in der humangenetischen Sprechstunde vorgestellt. Zu diesem Zeitpunkt sprach er nur wenige Worte. Laut der Mutter wurden die Meilensteine der Entwicklung verzögert erreicht (Sitzen: mit 1 Jahr, Laufen: mit 2,5 Jahren, erste Worte: mit 1,5 Jahren). Der Grad der intellektuellen Beeinträchtigung wurde aufgrund der gering retardierten motorischen Entwicklung als noch leicht eingestuft (Zhang et al. 2005). Er besuchte eine Schule für geistig Behinderte. Dort war er ein Einzelgänger und vermied den Kontakt zu anderen Kindern. Er litt unter Enuresis nocturna und Einschlafstörungen.

Auch bei Familie C (siehe Abbildung 3.14) wurde der Verdacht einer XLMR aufgrund zweier Halbbrüder der gleichen Mutter mit ähnlichen Phänotypen gestellt. Alle anderen Familienmitglieder waren klinisch unauffällig.

3.2.3.2 Ergebnisse der genetischen Diagnostik

Bei dem Indexpatienten (III.2) der Familie C wurde durch eine von unseren Kooperationspartnern des Department of Medical Genetics in Utrecht durchgeführte NGS-Technologie der kodierenden Bereiche des X-Chromosoms als einzige Variante mit möglicher pathogener Bedeutung ein Basenaustausch im Exon 1 des *KCND1*-Gens (c.259G>A) gefunden. Die Veränderung stellte eine Missense-Mutation dar, durch die es zu einem Austausch der Aminosäure Aspartat gegen Asparagin auf Proteinebene (p.D87N) kam. Zur Validierung dieses Ergebnisses wurde eine Sequenzierung nach Sanger des Exons 1 durchgeführt. Zur weiteren Segregationsanalyse wurden der Halbbruder (III.1), die Mutter (II.2), die Großmutter (I.2) und deren zweite, gesunde Tochter (II.4) untersucht. Es ergab sich folgender Stammbaum (siehe Abbildung 3.15). Der Indexpatient (III.2) und sein ebenfalls betroffener Halbbruder (III.1) wiesen die Mutation auf, deren Mutter (II.2) und Großmutter (I.2) waren Trägerinnen der Variante in heterozygoter Form und bei der Tante (II.4) und dem Großvater (I.1) wurde die Variante ausgeschlossen. Die untersuchte XCI der Mutter (II.2) erbrachte ein unauffälliges Ergebnis (65:35).

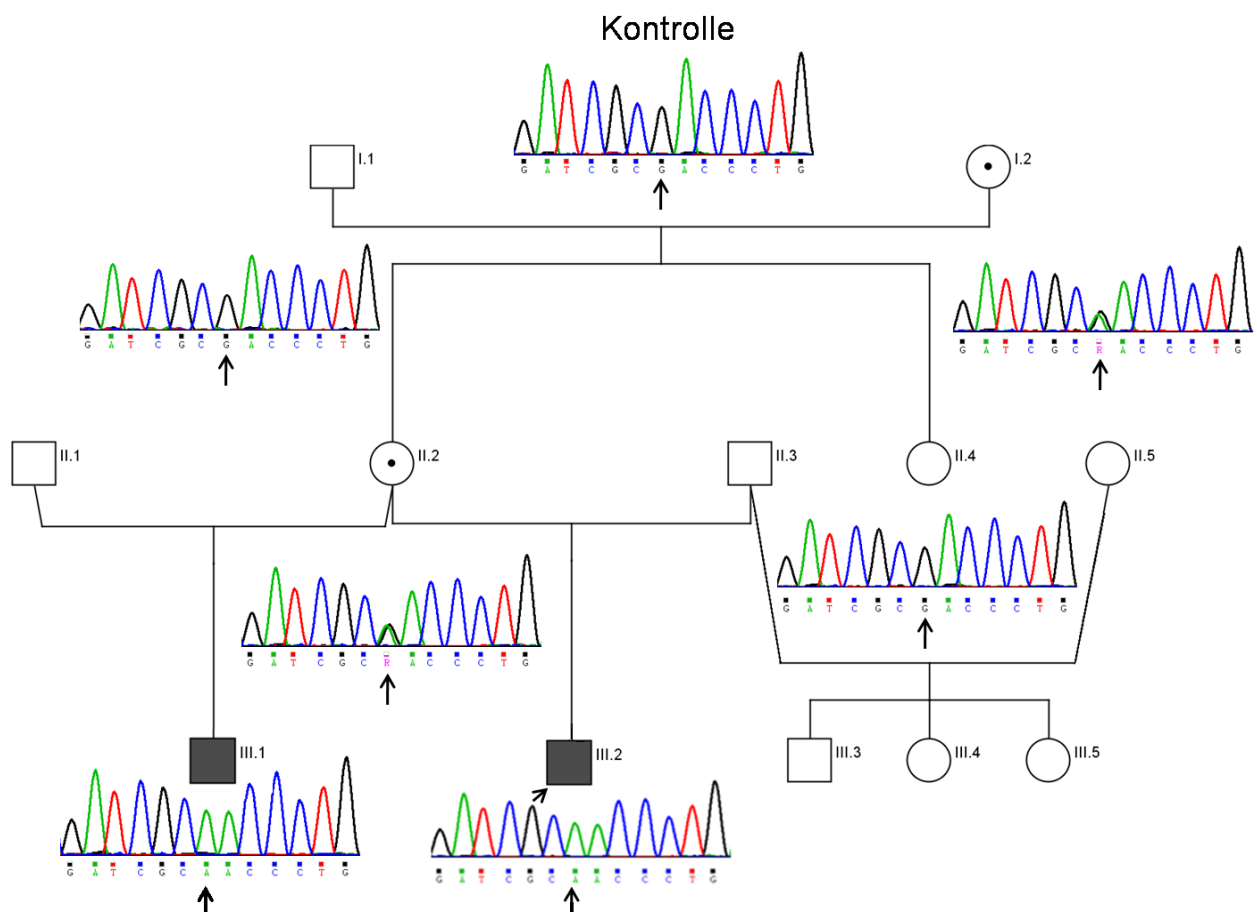


Abbildung 3.15 Sequenzierungsergebnisse der Familie C

Der schräge Pfeil zeigt auf den Indexpatienten, grau hinterlegte Felder markieren betroffene Familienmitglieder, der Punkt markiert Konduktorinnen. Die senkrechten Pfeile weisen jeweils auf die entscheidende Stelle in der Sequenz hin. Bei der Kontrolle, dem Großvater (I.1) und der Tante (II.4) liegt der Wildtyp mit der Base G an der Stelle 259 vor. Der Indexpatient (III.2) und sein Halbbruder (III.1) zeigen an dieser Stelle den Basenaustausch G zu A. Deren Mutter (II.2) und Großmutter (I.2) besitzen zwei Allele, mit und ohne Basenaustausch.

3.2.4 Familie D

3.2.4.1 Klinische Daten

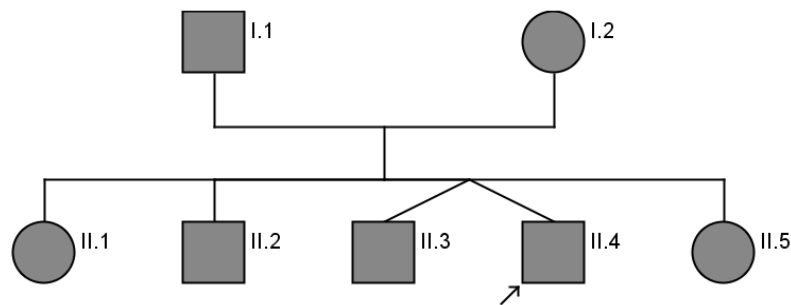


Abbildung 3.16 Stammbaum der Familie D

Der Pfeil zeigt auf den Indexpatienten, grau hinterlegte Felder markieren klinisch auffällige Familienmitglieder mit einer Entwicklungsverzögerung oder Intelligenzminderung unterschiedlichen Ausmaßes.

Den Stammbaum der Familie D gibt Abbildung 3.16 wieder. Der Indexpatient (II.4) wurde im Alter von 3,5 Jahren vorgestellt. Er konnte zu diesem Zeitpunkt frei Laufen, sprachlich äußerte sich der Junge nur über Silben und Laute. Sein Zwillingsbruder (II.3) lief aufgrund von Spitzenfüßen verzögert. Erste Worte sprach er mit 1,5 Jahren, mit 3,5 Jahren waren 3-Wort-Sätze möglich. Die älteste Schwester (II.1) war bei Erstkontakt 6,5 Jahre alt. Freies Laufen erlernte sie mit 18 Monaten, erste Worte ab dem zweiten Lebensjahr. Der ältere Bruder (II.2) wurde mit 5 Jahren vorgestellt. Er konnte mit 1 Jahr erste freie Schritte tätigen. Er besucht den integrativen Kindergarten und war laut Eltern zeitgerechter entwickelt als die älteste Schwester. Die 2-jährige jüngste Schwester (II.5) konnte mit 11 Monaten laufen und sprach erste Worte ab dem ersten Lebensjahr. Sie durchlief laut Aussage der Eltern bisher die unauffälligste Entwicklung. Bei keinem der Kinder waren organische Fehlbildungen oder schwerwiegende Erkrankungen bekannt. Auch der Körperbau der Kinder war unauffällig, syndrom-spezifische äußerliche Merkmale fanden sich bei keinem. Der 42-jährige Vater der Kinder (I.1) lernte ebenfalls aufgrund einer Fußfehlstellung (Klumpfuß) verzögert laufen. Er hatte Sprachprobleme, besuchte die Sonderschule und machte keine Ausbildung. Die 31-jährige Mutter (I.2) hatte ebenfalls Sprachprobleme, besuchte die Sonderschule und vollendete keine Ausbildung. Alle Familienmitglieder wurden als leicht mental retardiert eingestuft (Zhang et al. 2005).

3.2.4.2 Ergebnisse der genetischen Diagnostik

Beim Indexpatienten (II.4) zeigte die Mikroarray-Analyse eine 1,76 Mb große Mikroduplikation in der chromosomalen Region 17q11.2 (arr[hg19]17q11.2(27976723_29735848)x3). Weiterhin wurde eine 2,32 Mb große Mikroduplikation in der chromosomalen Region 22q11.21q11.22 (arr[hg19]22q11.21q11.22(19914853_22230199)x3) gefunden. Die MLPA mit selbstentworfenen Sonden in den fraglichen Regionen wurde zur Validierung dieses Ergebnisses eingesetzt. Die beiden Sonden für das Chromosom 22 RTN4R_ex2 und SLC7A4_ex2 und die Sonde auf Chromosom 17

SLC6A4_ex2 zeigten eine Dosiserhöhung (siehe Abbildung 3.17). Damit konnte das Ergebnis der Mikroarray-Analyse bestätigt werden. Bei der ältesten Schwester (II.1) ergab sich eine identische Signalkonstellation.

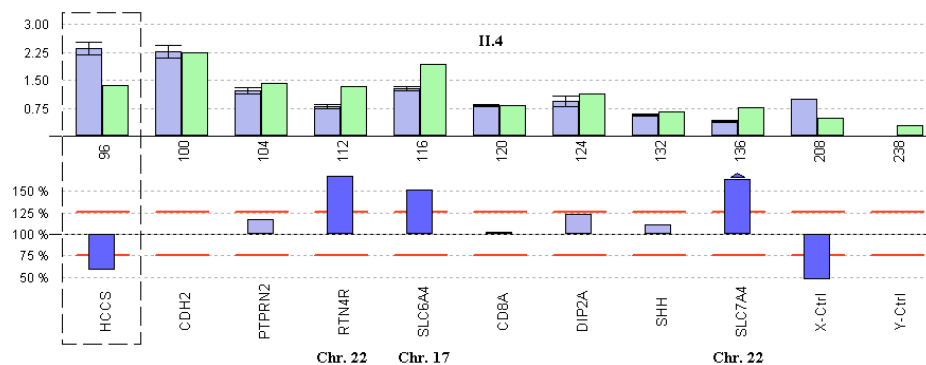


Abbildung 3.17 MLPA-Ergebnisse des Indexpatienten (II.4), exemplarisch für II.1

Sowohl beim Indexpatienten (II.4) als auch bei der ältesten Schwester (II.1) zeigte die MLPA eine Dosiserhöhung in den Chromosomen 17 und 22.

Der Vater (I.1) und die jüngste Tochter (II.4, siehe Abbildung 3.18) zeigten lediglich die Dosiserhöhung auf Chromosom 17.

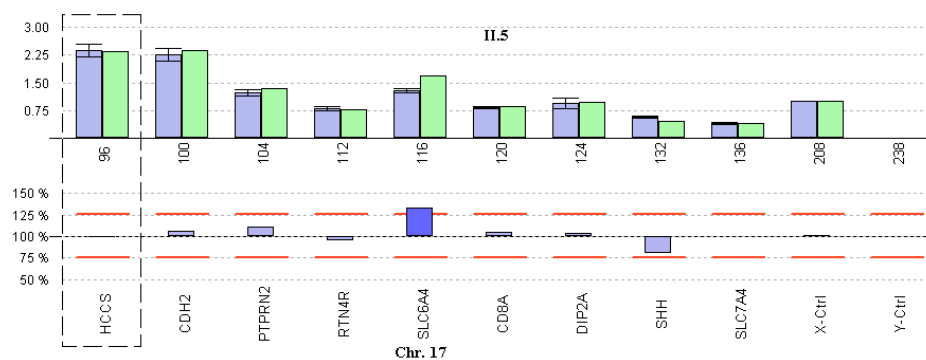


Abbildung 3.18 MLPA-Ergebnisse der jüngsten Schwester (II.5), exemplarisch für I.1

Sowohl beim Vater I.1 als auch bei der jüngsten Schwester II.5 ist lediglich eine Dosisvermehrung im Chromosom 17 zu verzeichnen.

Bei der Mutter (I.2) und dem Zwillingbruder (II.3) des Indexpatienten konnte eine Dosiserhöhung der Sonden RTN4R_ex2 und SLC7A4_ex2 auf Chromosom 22 detektiert werden (siehe Abbildung 3.19).

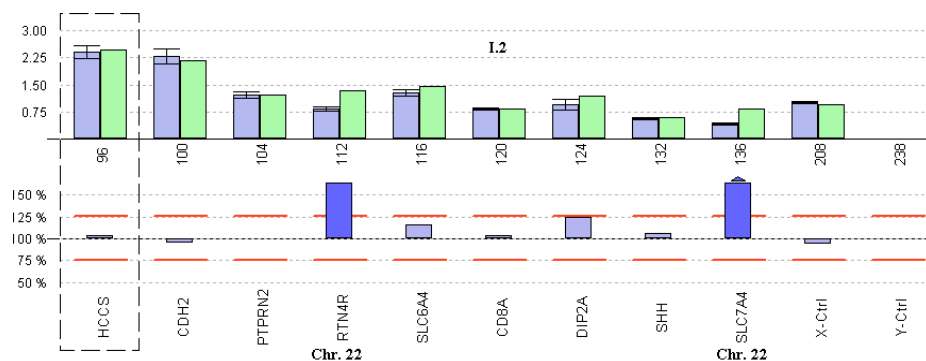


Abbildung 3.19 MLPA-Ergebnisse der Mutter (I.2), exemplarisch für II.3

Sowohl bei der Mutter I.2 als auch bei dem Zwillingbruder des Indexpatienten (II.3) konnte ausschließlich eine Dosiserhöhung im Chromosom 22 gefunden werden.

Beim ältesten Bruder (II.2) konnte keine Dosisveränderung gefunden werden (siehe Abbildung 3.20).

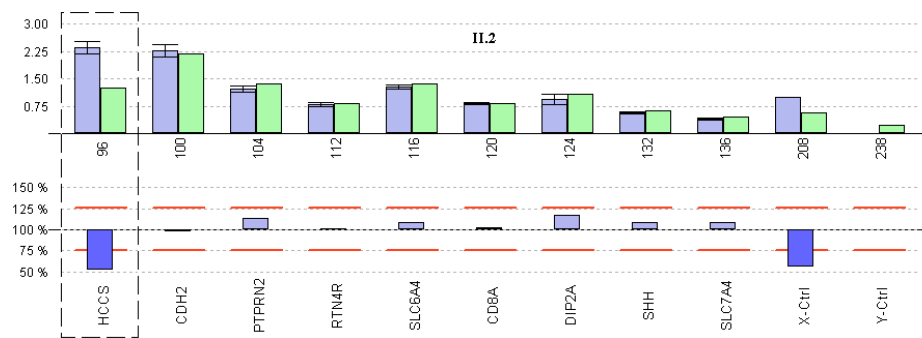


Abbildung 3.20 MLPA-Ergebnisse des ältesten Bruders (II.2)

Beim ältesten Bruder (II.2) ist weder eine Duplikation im Chromosom 17 noch im Chromosom 22 zu eruieren.

So konnte folgender Stammbaum erhoben werden (siehe Abbildung 3.21). Die älteste Schwester (II.1) und der Indexpatient (II.4) trugen sowohl die Mikroduplikation in der chromosomalen Region 17q11.2 als auch in der chromosomalen Region 22q11.21q11.22. Der Vater (I.1) und die jüngste Tochter (II.5) hatten die Mikroduplikation des Chromosoms 17, die Mutter (I.1) und der Zwillingbruder des Indexpatienten (II.3) die des Chromosoms 22. Der älteste Bruder (II.2) war genotypisch unauffällig.

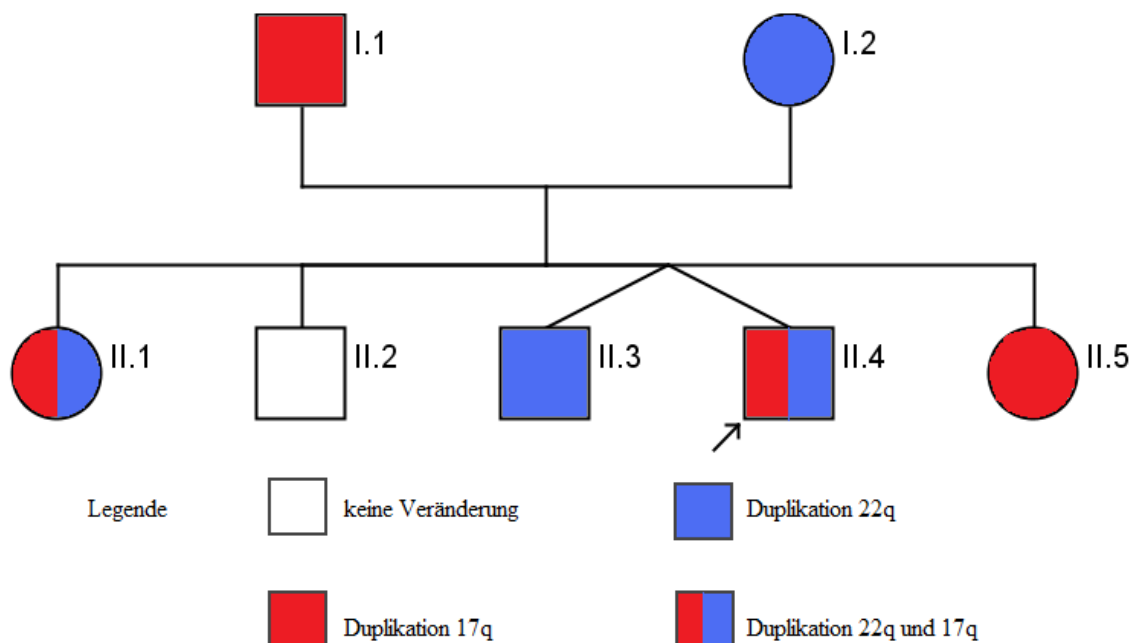


Abbildung 3.21 Stammbaum Familie D mit Darstellung der Ergebnisse der genetischen Diagnostik

Der Pfeil zeigt auf den Indexpatienten (II.4). Er und seine älteste Schwester (II.1) tragen beide Duplikationen, im Chromosom 17 und im Chromosom 22. Die Mutter (I.1) und die jüngste Tochter (II.5) besitzen nur die Duplikation im Chromosom 17, der Vater (I.2) und der Zwillingbruder (II.3) des Indexpatienten lediglich die im Chromosom 22. Der älteste Bruder (II.2) trägt keine der beiden Duplikationen.

4. Diskussion

4.1 Datenbankanalyse

4.1.1 Geschlechterverhältnis, Altersverteilung, Grad der MR

Bei der vergleichenden Betrachtung der Ergebnisse aus der Magdeburger Kohorte mit den Daten aus der Literatur (Quelle: PubMed, siehe Tabelle A.27) konnten viele Parallelen und einige Unterschiede identifiziert werden. Das männliche Geschlecht ist häufiger von MR betroffen als das weibliche (1,5:1) (Battaglia und Carey 2003). Dieses Verhältnis entspricht ziemlich exakt dem in der Magdeburger Kohorte erhobenen Geschlechterverhältnis (1,6:1). Die untersuchte Kohorte war zwar durch ihre Auswahl (Patienten eines universitären Instituts für Humangenetik) nur bedingt repräsentativ für die regionale Bevölkerung, aber eine geschlechtsabhängige Selektion ist durch die hohe Übereinstimmung mit den Daten aus der Literatur unwahrscheinlich. In der Literatur wird darüber hinaus beschrieben, dass sich das Geschlechterverhältnis angleichen, gegebenenfalls sogar leicht umkehren kann, je höher der Schweregrad der MR ist (Kaufman et al. 2010). Diese Beobachtung konnte in den eigenen Ergebnissen nicht nachvollzogen werden, da hier das Verhältnis in der schweren Retardierungsgruppe sogar noch weiter in Richtung männlicher Betroffener verschoben war (siehe Tabelle 3.2). Die Änderung des Geschlechterverhältnisses in den Schweregradgruppen erreichte zwar kein statistisches Signifikanzniveau ($p=0,249$), jedoch zeigte sich eine Tendenz entgegen der Beschreibung von Kaufman et al. (2010). Am ehesten ist diese Beobachtung durch die begrenzte Anzahl der untersuchten Patienten in der schweren Retardierungsgruppe ($n=77$) erklärbar. Im Verhältnis zu den 421 Patienten mit einer leichten MR, war die Anzahl der Betroffenen zu gering, um relevante Aussagen treffen zu können. Weiterhin ist als Einschränkung dieser Beobachtung einzuräumen, dass die Einteilung in die jeweiligen Schweregradgruppen der MR bei 89,1% (524/588) der Betroffenen aufgrund der verfügbaren Angaben zu den kognitiven Fähigkeiten geschätzt wurde, sodass auch durch diesen Fakt eine Ungenauigkeit möglich ist. Dies dürfte insbesondere für sehr junge Kinder zutreffen. Falls es einen Zusammenhang zwischen dem Alter bei der Vorstellung und dem Grad der MR gäbe, wäre eine frühere Vorstellung schwer retardierter Kinder zu vermuten, da diese durch frühes Nichterreichen der Meilensteine der Entwicklung auffallen (Leonard und Wen 2002). Dies konnte in den eigenen Daten nicht nachvollzogen werden (siehe Tabelle 3.3). Ein Problem bei dieser Betrachtung stellte der hohe Anteil der Betroffenen mit nicht einschätzbarem IQ dar. In den jüngsten Altersgruppen erklärte sich dieser zum einen durch das Fehlen standardisierter Intelligenztests in dieser Gruppe und zum anderen durch zahlreiche Vorstellungen morphologisch auffälliger Neugeborener kurz nach der Entbindung. Die leichte Zunahme der Vorstellungen schwer retardierter Betroffener in der Altersgruppe der 10- bis 14-Jährigen könnte auf einen Zusammenhang mit dem Beginn der Pubertät hinweisen. Betroffene, die

bereits in der frühen Kindheit auffällig waren, können aufgrund der hormonellen Einflüsse in der Pubertät stärker ausgeprägte Auffälligkeiten (vor allem im Verhalten) aufweisen (Blakemore et al. 2010). Durch den daraus wachsenden Leidensdruck der Eltern könnte die Zunahme der Vorstellungen von Betroffenen mit MR innerhalb dieser Altersgruppe im humangenetischen Institut erklärt werden. Die Prävalenz von leichter MR ist höher (1-3%) als die der schweren Ausprägung (0,3-0,5%) (Chelly et al. 2006). Insgesamt sollen von allen Retardierungsfällen in der binären Klassifikationsweise, die in vielen Übersichtsstudien verwendet wird, 85% auf die leichte Ausprägung entfallen (van Bokhoven 2011). In der Magdeburger Kohorte waren 71,6% (421/588) [KI: 0,678; 0,752] leicht und 13,1% (77/588) schwer mental retardiert. Die übrigen 15,3% (90/588) entfielen auf nicht einschätzbare Betroffene. Da ein Teil dieser 15,3% unter Annahme der Normalverteilung noch in die Gruppe der leichten MR gehören dürfte, ist davon auszugehen, dass beide Ergebnisse, die von van Bokhoven (2011) und die der hier verwendeten Magdeburger Datenbank, ähnliche Ergebnisse auswiesen. Bei der ausschließlichen Betrachtung der Betroffenen, deren IQ getestet wurde (n=64), zeigte sich ebenfalls ein Überwiegen der Personen mit leichter MR (76,6% [49/64], [KI: 0,643; 0,862]). Bei dieser Betrachtung liegt der in der Literatur beschriebene Wert (85%) im 95%-igen Konfidenzintervall unserer Kohorte. Damit war die Magdeburger Kohorte im Schweregrad der intellektuellen Beeinträchtigung vergleichbar mit der Prävalenz der in der anderen Studie verwendeten Kohorte. Es erfolgte keine Selektion besonders schwerer Fälle.

4.1.2 Diagnostikmöglichkeiten, Diagnosequote und -spektrum

Die hohe Anzahl an Patienten, die zum Zeitpunkt der Datenerhebung nur eine Vorstellung im Institut für Humangenetik hatten, erklärte sich durch die vielen nicht-syndromalen leichten Retardierungsfälle und einige konsiliarische Vorstellungen in der Kinderklinik. Häufig wurde bei diesen Patienten weder von den Eltern, noch von den Untersuchern aufgrund einer fehlenden Verdachtsdiagnose eine erneute Vorstellung forciert. Die eigenen Daten (siehe Tabelle 3.4) bestätigten, dass vor allem ein schweres Krankheitsbild zu einer Wiedervorstellung im Institut für Humangenetik der OVGU Magdeburg führte. Ein Grund hierfür könnte der erhöhte Leidensdruck der Eltern sein, der mit einer schweren MR einhergeht (Curry et al. 1997). Der signifikante Unterschied in den eigenen Daten ($p < 0,001$) musste jedoch kritisch betrachtet werden. Zu beachten ist, dass viele Zweitvorstellungen erst Jahre nach der Erstvorstellung stattfanden und somit die Möglichkeit besteht, dass weitere Zweitvorstellungen in der Zukunft folgen werden. Eine Aussage über den Grund einer Zweitvorstellung und über den zeitlichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Merkmalen und der Durchführung von Untersuchungen war durch die Datenbankanalyse nicht möglich. Weiterhin erfolgte die Zweitvorstellung bei einigen Patienten nach gezielter Einladung im Rahmen der Intensivierung der genetischen Beratung und somit nicht aus Eigeninitiative. Entsprechend der in der Literatur genannten Empfehlungen (Curry et al. 1997) wurde von einem überwiegenden Anteil der Betroffenen ein Karyogramm erstellt und bei knapp

der Hälfte wurde das *FMR1*-Gen untersucht. Ab 2010 war, ebenfalls bedingt durch die strukturellen Veränderungen im Institut für Humangenetik in Magdeburg, eine Zunahme der durchgeführten Untersuchungen, insbesondere der verstärkte Einsatz der Mikroarray-Analyse, zu verzeichnen (siehe Abbildung 3.3). Eine Aussage über einen Zusammenhang zwischen der Art und der Anzahl der Untersuchungsmethode und der Aufklärungsrate im jeweiligen Untersuchungsjahr konnte aufgrund der gezielten Wiedereinbestellungen nicht getroffen werden. Ein Problem stellte dabei die fehlende Datenbankeingabemöglichkeit bezüglich des Zeitpunktes der Untersuchung dar. Der Betroffene behielt seine Nummer aus dem Jahr der Erstvorstellung, auch wenn bestimmte Untersuchungen erst Jahre später durchgeführt wurden und damit eine genetische Diagnose verzögert gestellt wurde. Somit spiegelte die Abbildung 3.4 nur den Anteil der Diagnostizierten nach Betitelung in der Datenbank wider, und nicht den tatsächlichen Anteil der Diagnostizierten im jeweiligen Untersuchungsjahr. Die Prävalenz der schweren MR ist nahezu konstant (Roeleveld et al. 1997), wohingegen die der leichten Form aufgrund ihrer Genese schwankt. Ursächlich für leichte MR sind sowohl genetische als auch Umweltursachen (unter anderem Bildungsstand der Mutter, Zugang zur Bildung und zum Gesundheitssystem) (Kaufman et al. 2010). Im Gegensatz dazu wird bei schwerer MR das Überwiegen von genetischen Ursachen postuliert (Kaufman et al. 2010). Wurden die 158 Patienten aus der hier untersuchten Kohorte, bei denen eine genetische Ursache der Retardierung gesichert werden konnte, in ihren jeweiligen Schweregradgruppen der MR betrachtet, wurde ersichtlich, dass eine genetische Diagnose bei 27,6% (116/421) aller leicht retardierten und bei 20,8% (16/77) aller schwer retardierten Betroffenen gefunden werden konnte. Dies schien den Aussagen von Kaufman et al. (2010) zu widersprechen, jedoch waren unter den 415 Betroffenen ohne gesicherte Diagnose viele Patienten, die entweder nur wenig oder gar keine genetische Diagnostik bekommen haben (vor allem in den früheren Untersuchungsjahren), sodass vermutlich durch eine erweiterte Diagnostik aller Betroffenen noch weitere Ursachen hätten gefunden werden können. Dafür sprach auch die relativ geringe Rate geklärter Fälle in unserer Kohorte (26,9%, [KI: 0,233; 0,306]) im Vergleich zu den von Curry et al. (1997) propagierten 30-50%. Zudem zeigte der hohe Anteil der Betroffenen mit einer gesicherten Diagnose und nicht einschätzbarem Schweregrad der MR (28,9% [26/90]), dass die Ergebnisse bei der leichten und der schweren MR nicht vollständig waren.

4.1.3 Einflüsse in der Schwangerschaft

Zu den exogenen Einflüssen, die das Ursachenbild von der MR prägen, gehören der Alkohol- und Zigarettenkonsum der Mutter während der Schwangerschaft. Die in der Tabelle 3.5 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Alkohol- und Zigarettenkonsum eher bei Fällen mit leichten Formen der MR eine Rolle spielt. Dies deckt sich mit der Annahme von Kaufman et al. (2010), dass die Ursache leichter Retardierungsfälle neben genetischen in exogenen Faktoren zu suchen ist. Die Anzahl der Fälle mit dokumentiertem Alkohol- und/oder Zigarettenkonsum in der Schwangerschaft in der

untersuchten Kohorte war allerdings zu klein für zuverlässige statistische Aussagen. Auch kann bei dieser retrospektiven Analyse nicht ausgeschlossen werden, dass die Genauigkeit der Anamneseerhebung in Bezug auf Schwangerschaftsnoxen durch die Erwartungen des genetischen Beraters aufgrund der Kenntnis des Patienten (und der Familie) beeinflusst war (Katsuki et al. 2006). Betroffene mit gesichert durch exogene Schädigungen bedingte MR fehlten in dieser Betrachtung, da diese nicht im Institut für Humangenetik vorgestellt wurden.

4.1.3.1 Alkoholkonsum während der Schwangerschaft

Von allen leichten Retardierungsfällen sind etwa 2% Alkohol-assoziiert (Leonard und Wen 2002). Die mittels Analyse unserer Datenbank erhobenen Werte zeigten, dass bei 3,6% (21/588) der Betroffenen ein Alkoholkonsum der Mutter während der Schwangerschaft angegeben wurde, 2,6% (15/588) bei leichten Retardierungsfällen, die übrigen aufgeteilt auf Betroffene mit niedrigem oder unbekanntem IQ (siehe Tabelle 3.5). Teilweise war dieser Konsum fraglich, da in einigen Fällen die Information darüber nur fremdanamnestisch, beispielsweise von der Pflegemutter, geliefert wurde. Trotzdem konnte eine gute Übereinstimmung des Wertes von Leonard und Wen (2002) (2%) mit den Ergebnissen unserer Datenbank-Analyse (2,6%, [KI: 0,014; 0,042]) beobachtet werden.

4.1.3.2 Zigarettenkonsum während der Schwangerschaft

Rauchen in der Schwangerschaft kann, vor allem bei Jungen, zu einem erniedrigten Geburtsgewicht führen (Zarén et al. 2000) und dieses erhöht wiederum das Risiko einer MR (Zubrick et al. 2000). Besonders ein Geburtsgewicht von unter 1.500g erhöht dieses Risiko um das Dreifache (Mervis et al. 1995). Von allen Betroffenen der Magdeburger Kohorte hatten 9,4% (55/588) ein zu geringes Geburtsgewicht, nahezu gleichmäßig aufgeteilt auf beide Geschlechter. Von diesen konnte bei 20,0% (11/55) ein Nikotinkonsum in der Schwangerschaft eruiert werden. Dies trat bei männlichen Patienten mit zu geringem Geburtsgewicht häufiger auf als bei weiblichen (siehe Tabelle 3.7). Diese Ergebnisse folgen zwar in der Tendenz denen von Zarén et al. (2000), jedoch ergab sich bei den Betroffenen mit normalem Geburtsgewicht und ohne Nikotinkonsum in der Schwangerschaft verglichen mit den Betroffenen mit reduziertem Geburtsgewicht und Nikotinkonsum kein signifikanter Unterschied in der Geschlechterverteilung ($p=0,226$).

4.1.4 Komorbiditäten

4.1.4.1 Verhaltensauffälligkeiten

Die drei zum ADHS passenden Suchkriterien kurze Aufmerksamkeitsspanne, aggressives/impulsives Verhalten und Hyperaktivität zeigten in der Magdeburger Kohorte alle ein Überwiegen im männlichen Geschlecht im Vergleich zum weiblichen (siehe Tabelle 3.6), welches mit der Aussage von Kelleher et

al. (2010) übereinstimmt. Auch die Kombination aus jeweils zwei oder allen drei Kriterien trat häufiger bei Jungen auf (Hyperaktivität und Aggressivität 90% [18/20], Hyperaktivität und kurze Aufmerksamkeitsspanne 80% [8/10], Aggressivität und kurze Aufmerksamkeitsspanne 100% [6/6], alle drei Merkmale 100% [4/4]). Bei Kindern mit leichter MR wird eine Prävalenz der hyperaktiven Störungen mit 8-39% angegeben (Ahuja et al. 2013). In der Magdeburger Kohorte konnte bei 8,8% (52/588) Hyperaktivität und bei 11,2% (66/588) Aggressivität bzw. Impulsivität festgestellt werden. Dabei überwog der Anteil der leicht Retardierten (84,6% [44/52] hyperaktiv; 86,4% [57/66] impulsiv). Diese Ergebnisse entsprechen tendenziell den von Ahuja et al. (2013) beschriebenen. Eine höhere Übereinstimmung zeigte sich mit der Kohorte von Emerson (2003). Emerson untersuchte 264 Kinder mit einer intellektuellen Beeinträchtigung, bei denen gleichzeitig eine psychiatrische Erkrankung festzustellen war. Von diesen hatten 8,7% eine hyperkinetische Störung, was in der Studie mit ADHS gleichgesetzt wurde (Emerson 2003). Dieser Anteil entsprach nahezu exakt dem der Magdeburger Kohorte mit einer hyperaktiven Störung (8,8%, [KI: 0,067; 0,114]).

4.1.4.2 Epilepsie

In einer Englischen Studie von Carey et al. (2016) wurden 14.751 Erwachsene mit einer intellektuellen Beeinträchtigung mithilfe des QOF (Quality and Outcomes Framework) identifiziert und hinsichtlich des Auftretens von chronischen Erkrankungen/Komorbiditäten untersucht. In der beschriebenen Kohorte litten 18,5% (2.731/14.751) an einer Epilepsie (Carey et al. 2016). Verglichen mit der Magdeburger Kohorte, in der 17,7% (104/588, [KI: 0,147; 0,210]) der Betroffenen eine Epilepsie hatten, zeigte sich eine hohe Übereinstimmung. Eine Einschränkung in dieser hohen Übereinstimmung ergab sich allerdings durch das unterschiedliche Altersspektrum beider Kohorten (Carey et al. betrachteten Erwachsene). In der Übersichtsarbeit von van Ool et al. (2016) wurde von einer Prävalenz der Epilepsie bei Personen mit MR von 20-30% ausgegangen, zunehmend je schwerer der Grad der intellektuellen Beeinträchtigung ist (van Ool et al. 2016). Diese Aussage entsprach den in der Magdeburger Kohorte erhobenen Ergebnissen. Hier zeigte sich eine Zunahme des prozentualen Anteils der schweren MR bei Epileptikern im Vergleich zur Kohorte ohne Epilepsie ($p < 0,001$).

4.1.4.3 Mikrozephalus

Zu den häufigsten in der Magdeburger Kohorte identifizierten Schädelauffälligkeiten zählte der Mikrozephalus (29,1% [171/588]). Von Ashwal et al. (2009) zusammengefasst zeigen 43-85% der Betroffenen mit Mikrozephalie Auffälligkeiten bei einer Bildgebung des Kopfes. In der Magdeburger Kohorte waren Auffälligkeiten in der zerebralen Bildgebung bei 94 Betroffenen zu konstatieren, von denen 35 mikrozephal waren. Damit hatten 20,5% (35/171, [KI: 0,147; 0,273]) der Patienten mit Mikrozephalus eine auffällige Bildgebung des Schädels. Diese Diskrepanz erklärte sich vor allem durch die häufig nicht durchgeführte Bildgebung bei Patienten mit leichter nicht-syndromaler MR.

Weiterhin waren viele Patientendaten nicht vollständig, weshalb eine fehlende Dokumentation nicht zwangsläufig die fehlende Durchführung bedingte. Der Grad der Mikrozephalie korreliert mit der Schwere der Hirnatrophie, der ventrikulären Dilatation und der MR (Ashwal et al. 2009). Zum Vergleich der Ergebnisse von Ashwal et al. (2009) wurden die Patienten der Magdeburger Kohorte mit Mikrozephalus in zwei Gruppen unterteilt (entsprechend der Unterteilung von Ashwal et al.). Bei der Betrachtung der Patienten innerhalb der Kopfumfangsgruppen mit und ohne Hirnatrophie und mit und ohne Ventrikelerweiterung konnte bei ersterem ein Ergebnis, welches in der Tendenz der Aussage von Ashwal et al. (2009) entspricht, erhoben werden, bei letzterem keine Tendenz erkannt werden (siehe Tabelle 3.7). Jedoch konnten beide Ergebnisse aufgrund der geringen Anzahl Betroffener (n=8, n=16) nicht für richtungsweisende Auswertungen verwendet werden. Bei dem Vergleich der Schweregrade der MR innerhalb der beiden Kopfumfangsgruppen war eine Tendenz ohne Erreichen eines Signifikanzniveaus ($p=0,092$) in Richtung der Ergebnisse von Ashwal et al. (2009) zu verzeichnen. Somit konnte ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der MR mit dem Grad der Mikrozephalie nur in der Tendenz beschrieben werden.

4.1.4.4 Makrozephalus

In der Magdeburger Kohorte wiesen 6,1% (36/588) der Patienten einen Makrozephalus auf. In einer Studie von Nevo et al. (2002) über Kinder mit neurologischen Entwicklungsstörungen wurde bei 1,4% der Kinder ein Makrozephalus beschrieben. Diese 62 Kinder wurden in zwei Gruppen unterteilt, ohne (67,7% [42/62]) und mit (32,3% [20/62]) gleichzeitigem Vorkommen von erweiterten Hirnventrikeln (Nevo et al. 2002). Es zeigte sich ein Überwiegen im männlichen Geschlecht sowohl in der Gruppe ohne (66,7% [28/42]) als auch mit (65,0% [13/20]) Ventrikelerweiterung. Da zu den neurologischen Entwicklungsstörungen, die bei Nevo et al. (2002) Beachtung fanden, nicht nur die MR gezählt wurde, waren die Ergebnisse nicht komplett auf die Ergebnisse der Magdeburger Kohorte übertragbar, jedoch konnten Tendenzen aufgezeigt werden. Von den 36 Kindern mit Makrozephalus in unserer Kohorte hatten ebenfalls mehr Kinder keine erweiterten Hirnventrikel (80,6% [29/36], [KI: 0,640; 0,918]), im Vergleich zu 19,4% (7/36, [KI: 0,082; 0,360]) mit Ventrikelerweiterung. Es zeigte sich nur in der Gruppe mit Ventrikelerweiterung ein Überwiegen des männlichen Geschlechtes (71,4% [5/7], [KI: 0,290; 0,963]). Bei Makrozephalen ohne Ventrikelerweiterung überwog das weibliche Geschlecht (62,1% [18/29]). Bei Nevo et al. (2002) wurde für Betroffene mit Erweiterung der Ventrikel ein signifikantes Risiko für eine MR beschrieben. Dementsprechend war in dieser Studie der IQ bei den makrozephalen Patienten mit Hydrozephalus geringer als der bei den Betroffenen ohne Ventrikelerweiterung. Diese Aussage konnte in unserer Kohorte nur tendenziell ($p=0,05$) nachvollzogen werden. Jedoch ist dies bei lediglich 7 Betroffenen mit und 29 Betroffenen ohne Ventrikelerweiterung ein fragliches Ergebnis.

4.1.5 Zusammenfassung

Insgesamt ließ sich bei den meisten Merkmalen eine Übereinstimmung der Magdeburger Kohorte mit den Daten der Literatur eruieren. Bei Diskrepanzen war die Ursache am ehesten in der geringen Anzahl Betroffener mit dem jeweiligen Merkmal zu finden. Es konnte heraus gearbeitet werden, dass die Magdeburger Kohorte mental Retardierter bezüglich der soziodemografischen Struktur der Kohorte, des Grades der intellektuellen Beeinträchtigung, der Einflüsse in der Schwangerschaft und der begleitenden Komorbiditäten vergleichbar mit anderen Kohorten mental Retardierter war. Es erfolgte, trotz des Patientengutes eines universitären Instituts für Humangenetik, keine Selektion beispielsweise besonders schwerer Fälle. Für die Zukunft bedeutet dies, dass die Magdeburger Kohorte für weiter reichende Betrachtungen (zum Beispiel im nationalen Vergleich) zur Verfügung stehen kann.

4.1.6 Limitationen der Datenbankanalyse und Ausblick in die Zukunft

Die Durchführung einer retrospektiven Studie birgt immer die Gefahr fehlerhafte Ergebnisse durch unvollständige Datensätze zu erhalten. Zwar wurden bestimmte Basisdaten wie Geburtsmaße, aktuelle Körpermaße, Stammbaum und körperliche Auffälligkeiten nahezu immer erhoben, jedoch gab es keinen standardisierten Fragebogen mit dem konkrete Angaben beispielsweise zu spezifischen körperlichen Merkmalen, Schwangerschaftsnoxen oder durchgeführten Untersuchungen erhoben wurden. Somit bedeutet die fehlende Dokumentation eines Merkmals nicht zwangsläufig das reale Fehlen desselben. Weiterhin sind bestimmte, vor allem körperliche, Untersuchungsergebnisse abhängig von der Wahrnehmung des Untersuchenden. Gleiches gilt für anamnestische Daten, die je nach gegenseitiger Sympathie und sozialer Erwünschtheit in unterschiedlichem Ausmaß preisgegeben bzw. hinterfragt werden. Auch muss davon ausgegangen werden, dass Patienten nicht immer korrekte Angaben gemacht haben. Vor allem bei fremdanamnestischen Angaben zum Beispiel durch Pflegefamilien könnte das zutreffen. Anhand der erhobenen Daten wurde der Grad der intellektuellen Retardierung bei 524 Betroffenen geschätzt. Somit ist sowohl von Seiten des Erstuntersuchers als auch vom Datenanalyst durch die subjektive Einschätzung der Intelligenzminderung eine Fehlerquelle zu erwarten. Die untersuchte Kohorte ist zum einen durch die Auswahl der Patienten (des universitären Instituts für Humangenetik) nicht repräsentativ für die regionale Bevölkerung, was die Aussagekraft der Ergebnisse limitiert. Zum anderen ist der Zugang zu einer humangenetischen Untersuchung nicht für alle Bevölkerungsgruppen gleich. Im Vergleich zu einer nicht selektierten Kohorte mental Retardierter fehlten in der Magdeburger Kohorte Betroffene mit geklärten metabolischen oder gesichert exogenen Ursachen der MR. Weiterhin war die geringe Anzahl Betroffener in einigen Untergruppen (zum Beispiel Makrozephalie [n=36] oder Alkoholkonsum in der Schwangerschaft [n=21]) als Limitation der Datenbankauswertung anzusehen. Je größer eine Stichprobe ist, umso valider sind die statistischen Ergebnisse. Aus diesem Grund sollte die Eintragung aller Patientendaten

mental Retardierter in die Datenbank fortgeführt werden. Idealerweise sollte der Untersuchende derjenige sein, der die Daten in die Datenbank aufnimmt, um eine weitere Fehlerquelle durch eine zweite subjektive Einschätzung eines anderen Eintragenden zu vermeiden. Hinsichtlich der statistischen Auswertung wäre eine Möglichkeit des Datentransfers in eine extern auswertbare Datenbank (beispielsweise SPSS) für den Umfang der Auswertung idealer gewesen. Dies sollte für künftige Analysen ermöglicht werden. Ebenso sollte die Eingabeoption für bestimmte Merkmale (zum Beispiel Teratogene) angepasst werden, indem anstatt eines Freitextes gezielte Auswahlmöglichkeiten erschaffen werden, die mit der Suchfunktion der Datenbank verknüpft sind. Dies würde verhindern, dass die Merkmale Zigaretten- und Alkoholkonsum bei einer weiteren Analyse erneut manuell ausgezählt werden müssen. Ein Vorteil in der Weiterführung der Datenbank liegt darin, gezielt nach morphologischen Auffälligkeiten unspezifisch mental retardierter Personen suchen zu können. So können beispielsweise gezielt Personen mit einer möglichen Veränderung im *BRWD3*-Gen ausfindig gemacht werden.

4.2 *BRWD3*-Mutationen als Ursache für ein X-gebundenes Syndrom mit Makrozephalie und mentaler Retardierung

Über das *BRWD3*-Gen ist bislang wenig bekannt. Es wurde erstmals 2005 von Kalla et al. im Zusammenhang mit chronisch lymphatischer B-Zell-Leukämie beschrieben. Das Gen besteht aus 44 Exons und hat eine Größe von 133 kb. Der Name „bromodomain and WD repeat-containing protein 3“ wurde aufgrund der acht WD40-Wiederholungen am aminoterminalen und der zwei Bromodomänen am carboxyterminalen Ende gewählt (Kalla et al. 2005). Die einzelnen Domänen lassen Rückschlüsse auf die vermeintliche Funktion des *BRWD3*-Gens zu. Bromodomänen sind in Proteinen zu finden, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind (Jeanmougin et al. 1997). Sie sind beispielsweise Bestandteil von Histon-Acetyltransferasen (Dhalluin et al. 1999), die für die Modifikation von Histonen verantwortlich sind. Proteine, die WD40-Repeats enthalten, können viele verschiedene Aufgaben haben, unter anderem bei der Ausbildung der Mitosespindeln, der Zytoskelettanordnung, der Kontrolle der Zellteilung und der Regulierung der Vesikelentstehung und deren Transport. Andere sind Bestandteile von small nuclear Ribonucleoprotein Partikeln (snRNP) und von Regulatoren der Transkription (Smith et al. 1999). Für das *BRWD3*-Protein wird aufgrund der Bromodomänen und der WD40-Wiederholungen vermutet, dass es die Funktion eines Transkriptionsfaktors hat (Kalla et al. 2005). Müller et al. (2005) fanden heraus, dass das *BRWD3*-Gen als positiver Regulator im JAK/STAT-Signalweg fungiert. Zudem wurde das Gen als möglicher Biomarker für Brustkrebs diskutiert (Suh et al. 2012). Keimbahnmutationen im *BRWD3*-Gen wurden im Zusammenhang mit XLMR erstmals im Jahre 2007 von Field et al. beschrieben. Grundlage dafür war ein systematisches Mutations-Screening von 718 X-chromosomalen Genen in 208 Familien mit vermuteter XLMR, bei dem zwei Familien (Familie 1, Familie 2) mit Veränderungen im *BRWD3*-Gen identifiziert wurden

(Tarpey et al. 2009). Die betroffenen Familienmitglieder zeigten einen Makrozephalus, einen Großwuchs, leichte Gesichtsdysmorphien, eine leichte bis moderate MR und eine Sprachentwicklungsverzögerung. Eine dritte Familie (Familie 3) wurde ursprünglich von Gedeon et al. (1994) beschrieben. Neben einer grenzwertigen bis leichten MR wiesen die betroffenen Mitglieder dieser Familie weder einen Makrozephalus noch einen Großwuchs auf (Gedeon et al. 1994). Die Fälle zweier weiterer Familien (Familie 4, Familie 5), bestehend aus einem bzw. vier Patienten, wurden von Grotto et al. (2014) publiziert. Beschrieben wurde bei den Betroffenen ein Makrozephalus, eine MR und Gesichtsdysmorphien (Grotto et al. 2014). Die im humangenetischen Institut des Universitätsklinikums Magdeburg untersuchten Familien (Familie A=6, Familie B=7) zeigen starke klinische Ähnlichkeiten zu den zwei Familien von Field et al. (2007) und Grotto et al. (2014) (siehe Tabelle 4.1). Die Entsprechung zur Originalliteratur der in der Tabelle 4.1 verwendeten Bezeichnungen der einzelnen betroffenen Familien werden in Tabelle A.28 aufgeführt. Allen Patienten gemeinsam ist das Auftreten eines Makrozephalus (ausgenommen Familie 3 und Patienten 2 und 4 von Familie 5), von milden Gesichtsdysmorphien und einer MR. Bei den Familien 2 und 4 fällt auf, dass bei den Jungen im Gegensatz zu allen anderen Kindern der Kopfumfang schon zur Geburt oberhalb der 97. Perzentile lag. Hochwüchsig waren nur die Betroffenen der Familien 1 (Patient 1), 4, 6 (Patient 2) und 7. Bei den Verhaltensauffälligkeiten, die außer bei den Familien 1 (Patient 2), 3, 5 (Patient 3) und 6 (Patient 1) beobachtet wurden, handelte es sich um Schüchternheit mit Zurückhaltung gegenüber Fremden, Aggressivität und Hyperaktivität. Die in der Tabelle 4.1 erwähnten Skelettveränderungen stehen unter anderem für Wirbelsäulenveränderungen wie Skoliose und Kyphose, Kniegelenk- und Fußfehlstellungen. Dysmorphologische Gemeinsamkeiten sind vor allem die prominente Stirn, die großen Ohren und das auffällige Kinn.

Tabelle 4.1 Vergleich der klinischen Daten bisher beschriebener Individuen mit einer Veränderung im BRWD3-Gen

Familie Merkmal	Familie 1		Familie 2		Familie 3	Familie 4	Familie 5				Familie 6		Familie 7
	(Field et al. 2007)				(Gedeon et al. 1994)	(Grotto et al. 2014)					Institut für Humangenetik		
	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 1	Pat. 2		Pat. 1	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3	Pat. 4	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 1
Alter bei Vorstellung (in Jahren)	17	38	13	9		20	27	25	24	19	7	10	2
mentale Retardierung	leicht	leicht - moderat	moderat	leicht	borderline-leicht	moderat	moderat	moderat	moderat	moderat	leicht	leicht	leicht
Sprachrückstand	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Verhaltens-auffälligkeiten	+		+	+		+	+	+	-	+	-	+	+
Alter bei Laufenlernen (in Monaten)	16		24	18		18	12	18	12	18			24
normale Geburtsmaße	+	+	KU: >97	KU: >97		makrosom, makrozephal	+	+	+	+	+	+	+
Kopfumfang (Perzentilen)	>98.	>98.	97.	>97.	<97.	>99.	>99.	90.-95.	99.	50.	>97.	>97.	>97.
Größe (Perzentilen)	>97.	>90.	0,4.-2.	50.		>99.	50.-90.	50.	50.-90.	50.	50.-90.	>97.	>97.
Gewicht (Perzentilen)	90.	60.	0,4.-2.	50.		>97.	>97.	50.-90.	90.-95.	30.-50.	50.-90.	90.-95.	>97.
prominente Stirn		+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
auffällige Ohren	+	+	+	+	+	+		+	+			+	
langes Gesicht	+		+										

	Familie 1		Familie 2		Familie 3	Familie 4	Familie 5				Familie 6		Familie 7
	Pat. 1	Pat. 2	Pat.1	Pat. 2		Pat. 1	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3	Pat. 4	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 1
auffälliges Kinn	+	+	+	+	+	+		+		+			
breite Hände/Füße	+					+	+	+	+	+	+	+	
überstreckbare Gelenke						+					+	+	
Skelett- veränderungen	+	+				+	+	+	+	+	+	+	
Nondescensus testis	+		+								+	-	-
muskuläre Hypotonie	+			+		+	-	-	-	-	+	+	+
präferentielle X- Inaktivierung	+				-						+/-		-
Mutation	Spleiß c.3325+1 G>T p.W1089Cfs*4		Frame-Shift c.946_947insA p.R316Kfs*21		Missense c.4786A>G p.K1596E	Deletion Exon 11-41	Nonsense c.3393C>G p.Y1131*				Missense c.712G>C p.A238P		Deletion Exon 34-35

Abkürzungen: Pat.: Patient; +: Merkmal vorhanden; -: Merkmal nicht vorhanden; (leeres Feld): keine Information vorhanden; KU: Kopfumfang.

Da die genaue Funktion des *BRWD3*-Gens und dessen Genprodukt noch nicht endgültig geklärt sind, fällt es schwer Aussagen über das bei Mutationen resultierende Krankheitsbild zu treffen. Die Existenz von ähnlichen Merkmalen zwischen den beschriebenen Personen lässt jedoch einen kausalen Zusammenhang zwischen einer Veränderung im *BRWD3*-Gen und Merkmalen wie Makrozephalie, MR, Verhaltens- und den beschriebenen morphologischen Auffälligkeiten vermuten. Die phänotypischen Unterschiede zwischen den einzelnen Familien können möglicherweise durch die verschiedenen Mutationsarten (Spleiß-, Frame-Shift-, Nonsense-, Missense-Mutationen und Deletionen) und damit bedingte Auswirkungen auf das Genprodukt erklärt werden. Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation ist aufgrund der geringen Anzahl Betroffener nicht möglich. Auch eine Abhängigkeit zwischen der Mutationsart und dem Schweregrad der MR kann nicht herausgestellt werden. Da es sowohl inter- als auch intrafamiliäre Unterschiede im Grad der intellektuellen Beeinträchtigung gibt, ist davon auszugehen, dass das Ausmaß der MR neben der Veränderung im *BRWD3*-Gen von anderen Faktoren beeinflusst wird. Verhaltensauffälligkeiten treten häufig in variabler Ausprägung bei Patienten mit MR auf (Lee und Jeoung 2016). Der überwiegende Anteil der beschriebenen Betroffenen zeigte Verhaltensauffälligkeiten, es lässt sich jedoch kein Verhaltensphänotyp bestimmen. Da die Entwicklung von Verhaltensauffälligkeiten stark vom sozialen Umfeld, in dem die Kinder aufwachsen, abhängt (Berryessa et al. 2013) und wenig Details über das soziale Umfeld der untersuchten Jungen bekannt sind, lässt sich das Vorkommen der Verhaltensauffälligkeiten insgesamt nur ungenau begründen. Wie in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei der XCI um eine Methode zur Kompensation von Gendosisunterschieden zwischen normalen weiblichen (XX) und normalen männlichen (XY) Organismen. Bei Chromosomenmutationen oder monogenen Veränderungen ist das defekte Chromosom im Rahmen des Selektionseffektes ausgeschaltet (Thode et al. 1988). Dadurch entsteht eine verschobene (80:20) bzw. hochgradig verschobene (90:10) XCI (Simmonds et al. 2014) bei Konduktorinnen. Dies könnte eine Erklärung sein, weshalb bei der phänotypisch unauffälligen Mutter der Familie A eine präferentielle XCI (98:2) vorliegt. Das defekte *BRWD3*-Gen scheint jedoch nicht konstant zu dieser negativen Selektion in Lymphozyten zu führen, da die Großmutter der Familie A und die Mutter der Familie B eine ausgeglichene XCI aufweisen. In einem Bericht über Dystrophinopathien beschrieben Juan-Mateu et al. (2012) die Möglichkeit eines Zusammenhangs zwischen Mutationsart und Vorkommen von verschobener XCI. Diese soll bei Überträgerinnen von Punktmutationen häufiger (71,4%) als bei Trägerinnen von Deletionen bzw. Duplikationen (46,7%) existieren (Juan-Mateu et al. 2012). Wenn man von einer „echten“ verschobenen XCI bei der Mutter A mit der Missense-Mutation und einer ausgeglichenen XCI bei der Mutter B mit der Deletion ausgeht, könnten diese Ergebnisse mit denen von Juan-Mateu et al. (2012) übereinstimmen. Bei ausgeglichener XCI sind Allele mit und ohne Mutation aktiv, es liegt also ein funktionelles Mosaik aus normalen und aberranten Zellen bei der betroffenen Frau vor. Vermutlich kann die geringe intellektuelle Beeinträchtigung der Großmutter der

Familie A und der Mutter der Familie B durch die fehlende präferentielle XCI erklärt werden. Dafür müsste aber das Muster der XCI der Lymphozyten dem Muster im Gehirn entsprechen. Für exakte Aussagen zum Krankheitswert von Veränderungen im *BRWD3*-Gen, zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation und über die Ursachen einer präferentiellen oder ausgeglichenen XCI sollten sich künftig vergleichende Untersuchungen an weiteren Betroffenen anschließen.

4.3 *KCND1* als mögliches neues Gen für eine X-gebundene mentale Retardierung

Bei Familie C wurde eine für das beschriebene Krankheitsbild möglicherweise kausale Mutation im *KCND1*-Gen gefunden. Das *KCND1*-Gen kodiert für den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv4.1, der vor allem im Nervensystem exprimiert wird (Gu und Barry 2011). Er besteht aus vier Untereinheiten (α), die gemeinsam eine Pore bilden. Jede dieser Untereinheiten besitzt sechs hochkonservierte hydrophobe transmembranäre Domänen (S1-S6), von denen die Segmente 5 und 6 den porenformenden Teil bilden, und zwei intrazelluläre N- und C-terminale Domänen, welche Stellen für posttranslationale Veränderungen tragen (Isbrandt et al. 2000, Gu und Gu 2014). Das *KCND1*-Gen liegt auf Chromosom Xp11.23-p11.3. Der Bereich zwischen Start- und Stoppcodon (ORF, open reading frame) umfasst 1.941 Nukleotide, entsprechend 647 Aminosäuren, aufgeteilt auf sechs Exons. Exon 1 ist mit 374 Aminosäuren das längste und kodiert für die Segmente 1 bis 5 und einen Anteil der Pore des spannungsabhängigen Kaliumkanals. Die übrigen fünf Exons kodieren für das C-terminale Ende. Bei der beschriebenen Familie C ist von dem Basenaustausch (c.259G>A) das Exon 1 betroffen. Da dieses für einen Teil des porenbildenden Segments kodiert, kann es sein, dass bei Entstehung eines stabilen Proteins, welches in die Membran eingelagert wird, der normalerweise stattfindende schnelle inaktivierende Kaliumauswärtsstrom (Typ A-Kanal) durch Ladungsänderungen beeinflusst wird. Weitere Möglichkeiten sind die Entstehung eines stabilen Proteins, welches durch Fehlfaltung unvollständig oder gar nicht in die Membran integriert wird oder die Entstehung eines instabilen Proteins. Der resultierende gestörte Ionenaustausch kann zu einer Störung der neuronalen Übertragung führen. In Nervenzellen exprimierte Kaliumkanäle regulieren normalerweise unter anderem die neuronale Plastizität und synaptische Transmission, indem sie die Neurotransmitterausschüttung in den synaptischen Spalt direkt über einen verminderten Kalziumeinstrom in das axonale Ende oder indirekt über Regulation der Aktionspotenzialweiterleitung beeinflussen (Gu und Barry 2011). Da *KCND1* mRNA von Isbrandt et al. (2000) in vielen verschiedenen Geweben, unter anderem im Gehirn (vor allem Kleinhirn, Amygdala und Thalamus), gefunden wurde, könnten Mutationen im *KCND1*-Gen möglicherweise ursächlich für neuronale Funktionsstörungen, beispielsweise im Zusammenhang mit Lernen und Gedächtnis, sein (Isbrandt et al. 2000). Dies könnte somit auch die MR mit Sprachentwicklungsverzögerung der beiden Söhne III.1 und III.2 der Familie C erklären. Zum Beweis der mutagenen Wirkung der Veränderung im *KCND1*-

Gen sind weitere Untersuchungen erforderlich. Zur Klärung ob eine stabile RNA entsteht, könnte eine Amplifikation des Exons 1 anhand einer cDNA erfolgen. Die Funktionsfähigkeit des Kanals sollte durch elektrophysiologische Versuche getestet werden. Weiterhin sind Analysen am Tiermodell (Drosophila, Maus) denkbar, um die Folgen von Veränderungen im *KCND1*-Gen zu präzisieren.

4.4 Submikroskopische Kopiezahlvarianten als Ursachen unspezifischer und familiärer mentaler Retardierung

Bei den Kopiezahlveränderungen, die in der Chromosomenregion 22q11.2 auftreten, handelt es sich häufig um Mikrodeletionen (DiGeorge- und velocardiofaziales Syndrom) und -duplikationen, die etwa im Verhältnis 2:1 vorkommen (Portnoi 2009). Sie haben rekurrente Bruchpunkte. Die fehlerhaften Rekombinations-Ereignisse, die zu den Kopiezahlveränderungen in dieser Region von meist 3 Mb Größe führen, werden durch sogenannte „low-copy-repeats“ getriggert. Dabei handelt es sich um kurze, etwa 10-300 kb lange, homologe Regionen, die zu etwa 95% ähnliche Sequenzen besitzen und durch deren Instabilität die Entstehung von Mikrodeletionen und -duplikationen gefördert wird (Leite et al. 2016). Die Mikroduplikation 22q11.2 wurde im Jahre 1999 von Edelman et al. erstmals erwähnt. Die häufigsten Charakteristika sind eine (meist leichte) MR mit Sprachrückstand, verzögerte psychomotorische Entwicklung, muskuläre Hypotonie, Verhaltensauffälligkeiten und unspezifische Gesichtsdysmorphien (Wentzel et al. 2008). In den meisten Fällen, wie auch bei Familie D, wird eine genreiche (circa 40 Gene), etwa 3 Mb umfassende Region dupliziert und von einem nur wenig oder gar nicht auffälligem Elternteil vererbt (Ribeiro-Bicudo et al. 2013), wofür eine unvollständige Penetranz oder eine Modifikation durch epigenetische Faktoren diskutiert wird (Valvo et al. 2012). Ebenfalls eine unvollständige Penetranz und stark variable Expressivität wurde bei Mikroduplikationen im Bereich 17q11.2 in einem ersten klinischen Bericht von Grisart et al. im Jahr 2008 beschrieben. In der betroffenen Familie waren von den sieben Trägern einer solchen Mikroduplikation nur fünf klinisch auffällig, unter anderem durch MR, frühen Haarausfall, Zahnschmelzhypoplasien und milde, unspezifische Gesichtsdysmorphien (Grisart et al. 2008). Bei von dieser Mikroduplikation betroffenen Personen wurden wiederholt Entwicklungsprobleme beschrieben (Grisart et al. 2008, Caselli et al. 2010, White et al. 2013, Rasmussen et al. 2016). Die rekurrente Mikroduplikationsregion 17q11.2 beinhaltet das Tumorsuppressorgen *NF1* (Gervasini et al. 2002), welches als Kandidatengen für die MR bei Patienten mit Mikroduplikation 17q11.2 diskutiert wird. Jedoch ist für die klinische Manifestation dieser Mikroduplikation sehr wahrscheinlich nicht nur das *NF1*-Gen verantwortlich, da es sich um ein CGS handelt. Die beiden beschriebenen Mikroduplikationen und andere rekurrente oder auch private submikroskopische Kopiezahlvarianten können gelegentlich bei Patienten mit unspezifischer oder nicht-syndromaler MR gefunden werden, nicht selten in Familien mit familiärer Häufung von Intelligenzminderung. Sie können ein starker genetischer Prädispositionsfaktor innerhalb einer eher multifaktoriellen Verursachung von MR sein

(Ropers 2010). In Familien mit eher leichten Formen einer Intelligenzminderung haben häufig die Partner der Betroffenen einen niedrigeren IQ, und so kann es für Kinder genetische Dispositionsfaktoren von Seiten beider Eltern geben. Zusätzlich können nicht genetische Faktoren (geringere Förderung durch das familiäre Umfeld, sozioökonomische Faktoren) dazukommen, die das multifaktorielle System komplettieren (Leonard und Wen 2002). Bei beiden erläuterten Mikroduplikationen steht die verzögerte, vor allem sprachliche, Entwicklung im Vordergrund. Dies stimmt mit den Merkmalen der Familie D überein. Daher ist zu vermuten, dass die wesentliche Ursache für die Sprachverzögerung und Intelligenzminderung der Eltern selbst und die verschiedenen Grade der MR bei vier von fünf Kindern in den Mikroduplikationen 17q11.2 und 22q11.2 zu suchen ist. Diese Beobachtung ist ein seltenes Beispiel für eine Familie, in der identifizierbare genetische Ursachen auf der Seite beider Eltern vorliegen. Dadurch lässt sich die Segregation der disponierenden genetischen Veränderungen in der Familie studieren. Für die beobachtete unterschiedliche Ausprägung der MR bei den Kindern dieser Familie müssen aber neben der Segregation der beiden Mikroduplikationen auch deren variable Expressivität, unvollständige Penetranz und nicht-genetische Faktoren in Betracht gezogen werden. Es zeigen sich keine klaren Genotyp-Phänotyp-Korrelationen. So ist festzustellen, dass die älteste Tochter (II.1) trotz des Vorhandenseins beider Mikroduplikationen einen eher leichten Phänotyp aufwies, wohingegen der Indexpatient (II.4), der ebenfalls die beiden Veränderungen trägt, stark betroffen war. Bei der scheinbar unauffälligen jüngsten Tochter (II.5) ist davon auszugehen, dass aufgrund ihres Alters zu ungenaue Aussagen über den Entwicklungsstand getroffen werden konnten. Der genotypisch gesunde Sohn II.2 wies trotz der Abwesenheit der (identifizierten) genetischen Veränderungen dennoch einen auffälligen Sprachrückstand auf. Hierfür könnte eine weniger fördernde häusliche Umgebung verantwortlich sein. Es könnte in der Familie im Sinne eines multifaktoriellen Konzepts aber auch noch andere nicht identifizierte genetische Dispositionsfaktoren geben. Bei dieser Familie wäre eine erneute Vorstellung im Institut für Humangenetik der OVGU Magdeburg nach einer gewissen Zeit (Jahre) sinnvoll, um den Entwicklungsstand jedes Kindes neu einzuschätzen. Wenn sich, insbesondere die Geschwister II.1 und II.4 mit Nachweis beider Duplikationen, stark im Grad der intellektuellen Beeinträchtigung unterscheiden, wären weitere molekulargenetische Untersuchungen (zum Beispiel NGS) angezeigt, um weitere ursächliche Veränderungen zu identifizieren.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie ist eine retrospektive Analyse einer Kohorte, die alle zwischen 2000 und 2012 im Institut für Humangenetik Magdeburg vorgestellten Patienten (n=588) mit Entwicklungsverzögerung umfasste. Deren Daten zu Stammbaum, klinischem Phänotyp, genetischen Untersuchungen und Ergebnissen wurden in einer Datenbank gesammelt und statistisch ausgewertet. Hierbei lag der Fokus auf der Geschlechter- und Altersverteilung, dem Einfluss von Schwangerschaftsnoxen, den diagnostischen Möglichkeiten und Komorbiditäten. Zusammenfassend betrachtet ist die Magdeburger Kohorte vergleichbar mit anderen Kohorten mental Retardierter. Es fand keine Selektion insbesondere bei der Geschlechterverteilung (61,6% männlich; 38,4% weiblich) und dem Grad der intellektuellen Retardierung (71,6% leichte; 13,1% schwere; 15,3% nicht einschätzbare MR) statt. Als Einschränkung der Studie müssen die zum Teil geringe Patientenzahl innerhalb der Subgruppen, der meist geschätzte Grad der intellektuellen Beeinträchtigung (n=524) und die Studienform (retrospektiv) beachtet werden. Nichtsdestotrotz kann die Magdeburger Kohorte für zukünftige weitere Betrachtungen genutzt werden. Neben der statistischen Auswertung war das Ziel dieser Arbeit die molekulargenetische Untersuchung von Patienten, deren Stammbaum sich während der Datenbankarbeit als auffällig erwies. Es konnten vier Familien (A-D) mit vermutlich kausalen Veränderungen, die zur Entstehung eines Krankheitsbildes einhergehend mit MR führen, identifiziert werden. Bei den Familien A und C wurde das X-Chromosom mittels NGS untersucht und es zeigte sich jeweils ein Basenaustausch, bei Familie A im *BRWD3*-Gen, bei Familie C im *KCND1*-Gen. Bei Familie B konnte eine Veränderung im *BRWD3*-Gen identifiziert werden. Zur Segregationsanalyse bei den Familien A bis C wurden vor allem die PCR (auch Multiplex-PCR und Long-Range-PCR), die Gelelektrophorese und die Sequenzierung nach Sanger verwendet. Die Veränderungen im *BRWD3*-Gen wurden in der Literatur bereits bei fünf Familien mit einem dem der Familien A und B ähnelndem Krankheitsbild beschrieben und sind somit als krankheitsverursachend anzusehen. Künftig wären standardisierte Suchkriterien, mit denen Betroffene mit einer potentiellen *BRWD3*-Mutation für gezielte molekulargenetische Tests identifiziert werden können, empfehlenswert. In der Literatur gibt es Hinweise, dass der Basenaustausch im *KCND1*-Gen zu einem defekten Kaliumkanal führt und dadurch krankheitsverursachend ist. Für den Beweis sollten sich weitere Untersuchungen anschließen. Die Familie D wurde aufgrund der bei allen Mitgliedern in unterschiedlichen Schweregraden auftretenden MR untersucht. Nach Identifikation zweier Duplikationen beim Indexpatienten durch Mikroarray-Analyse, erfolgte bei der Familie D die molekulargenetische Untersuchung mittels MLPA. Es zeigte sich eine Duplikation beim Vater (17q11.2) und eine weitere Duplikation bei der Mutter (22q11.21q11.22). Diese wurden in unterschiedlicher Ausprägung an die Kinder weitergegeben. Inwieweit ausschließlich diese Duplikationen ursächlich für die MR waren oder zudem zusätzliche Faktoren Einfluss hatten, sollte nach erneuter klinischer Einschätzung der Familie geklärt werden.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Aaij, C.; Borst, P. (1972): The gel electrophoresis of DNA. In: *Biochimica et biophysica acta* 269 (2), S. 192–200.
- 2 Abel, H. J.; Duncavage, E. J. (2013): Detection of structural DNA variation from next generation sequencing data: a review of informatic approaches. In: *Cancer genetics* 206 (12), S. 432–440.
- 3 Afroze, B.; Chaudhry, B. (2013): Genetics of non-syndromic autosomal recessive mental retardation. In: *Journal of the Pakistan Medical Association* 63 (1), S. 106–110.
- 4 Ahuja, A.; Martin, J.; Langley, K.; Thapar, A. (2013): Intellectual disability in children with attention deficit hyperactivity disorder. In: *The Journal of pediatrics* 163 (3), S. 890-5.e1.
- 5 Armatas, V. (2009): Mental Retardation: Definitions, Etiology, Epidemiology and Diagnosis. In: *Journal of Sport and Health Research*, S. 112–122.
- 6 Ashwal, S.; Michelson, D.; Plawner, L.; Dobyns, W. B. (2009): Practice parameter: Evaluation of the child with microcephaly (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. In: *Neurology* 73 (11), S. 887–897.
- 7 Bajrami, E.; Spiroski, M. (2016): Genomic Imprinting. In: *Open access Macedonian journal of medical sciences* 4 (1), S. 181–184.
- 8 Barnes, W. M. (1994): PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (6), S. 2216–2220.
- 9 Battaglia, A.; Carey, J. C. (2003): Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation: An overview. In: *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics* 117 (1), S. 3–14.
- 10 Beckman Coulter (2007): Agencourt CleanSEQ-Aufreinigung von Sequenzierprodukten. System zur Aufreinigung von Sequenzierprodukten (Dye Removal). Online verfügbar unter http://www.beckmancoulter.de/Life+Science/Molekularbiologie/DNA_RNA_Aufreinigung/Agencourt+CleanSEQ.html, zuletzt geprüft am 09.07.2017.
- 11 Beckman Coulter (2009): Agencourt AMPure XP-PCR Produktaufreinigung. System zur Aufreinigung von PCR-Produkten (Primer Removal). Online verfügbar unter http://www.beckmancoulter.de/Life+Science/Molekularbiologie/DNA_RNA_Aufreinigung/AMPure+XP.html, zuletzt geprüft am 09.07.2017.
- 12 Berryessa, C. M.; Martinez-Martin, N. A.; Allyse, M. A. (2013): Ethical, Legal and Social Issues Surrounding Research on Genetic Contributions to Anti-Social Behavior. In: *Aggress Violent Behav* 18 (6), S. 605–610.
- 13 Biesecker, L. G.; Spinner, N. B. (2013): A genomic view of mosaicism and human disease. In: *Nature reviews. Genetics* 14 (5), S. 307–320.
- 14 Biran-Gol, Y.; Malinger, G.; Cohen, H.; Davidovitch, M.; Lev, D.; Lerman-Sagie, T.; Schweiger, A. (2010): Developmental outcome of isolated fetal macrocephaly. In: *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 36 (2), S. 147–153.
- 15 Blakemore, S.-J.; Burnett, S.; Dahl, R. E. (2010): The role of puberty in the developing adolescent brain. In: *Human brain mapping* 31 (6), S. 926–933.
- 16 Boehm, C. D. (1989): Use of polymerase chain reaction for diagnosis of inherited disorders. In: *Clinical chemistry* 35 (9), S. 1843–1848.

- 17 Brockhaus (2015): Entwicklung des Kindes. Online verfügbar unter <http://www.brockhaus.de/de/schule>, zuletzt geprüft am 09.07.2017.
- 18 Brody, J. R.; Kern, S. E. (2004): History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. In: *Analytical biochemistry* 333 (1), S. 1–13.
- 19 Brown, C. J.; Robinson, W. P. (2000): The causes and consequences of random and non-random X chromosome inactivation in humans. In: *Clinical genetics* 58 (5), S. 353–363.
- 20 Burnside, R. D. (2015): 22q11.21 Deletion Syndromes: A Review of Proximal, Central, and Distal Deletions and Their Associated Features. In: *Cytogenetic and genome research* 146 (2), S. 89–99.
- 21 Carey, I. M.; Shah, S. M.; Hosking, F. J.; DeWilde, S.; Harris, T.; Beighton, C.; Cook, D. G. (2016): Health characteristics and consultation patterns of people with intellectual disability: a cross-sectional database study in English general practice. In: *The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners* 66 (645), S. e264-70.
- 22 Carvill, G. L.; Mefford, H. C. (2015): Next-Generation Sequencing in Intellectual Disability. In: *Journal of pediatric genetics* 4 (3), S. 128–135.
- 23 Caselli, R.; Ballarati, L.; Selicorni, A.; Milani, D.; Maitz, S.; Valtorta, C.; Larizza, L.; Giardino, D. (2010): A 12.4 Mb duplication of 17q11.2q12 in a patient with psychomotor developmental delay and minor anomalies. In: *European journal of medical genetics* 53 (5), S. 325–328.
- 24 Chelly, J.; Khelifaoui, M.; Francis, F.; Chérif, B.; Bienvenu, T. (2006): Genetics and pathophysiology of mental retardation. In: *European journal of human genetics* 14 (6), S. 701–713.
- 25 Cheon, C. K. (2016): Genetics of Prader-Willi syndrome and Prader-Will-Like syndrome. In: *Annals of pediatric endocrinology & metabolism* 21 (3), S. 126–135.
- 26 Curry, C. J.; Stevenson, R. E.; Aughton, D.; Byrne, J.; Carey, J. C.; Cassidy, S.; Cunniff, C.; Graham, J. M.; Jones, M. C.; Kaback, M. M.; Moeschler, J.; Schaefer, G. B.; Schwartz, S.; Tarleton, J.; Opitz, J. (1997): Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. In: *American journal of medical genetics* 72 (4), S. 468–477.
- 27 Detwiler, M. M.; Hamp, T. J.; Kazim, A. L. (2004): DNA sequencing using the liquid polymer POP-7 on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer. In: *BioTechniques* 36 (6), S. 932–933.
- 28 Deutsche Gesellschaft für Neugeborenencreening e.V. (2005): Nationaler Screeningreport 2004. DGNS. Unter Mitarbeit von U. Nennstiel-Ratzel. Online verfügbar unter <http://www.screening-dgns.de/reports.php>, zuletzt geprüft am 09.07.2017.
- 29 Dhalluin, C.; Carlson, J. E.; Zeng, L.; He, C.; Aggarwal, A. K.; Zhou, M. M. (1999): Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. In: *Nature* 399 (6735), S. 491–496.
- 30 Donnelly, N.; Storchová, Z. (2014): Dynamic karyotype, dynamic proteome: buffering the effects of aneuploidy. In: *Biochimica et biophysica acta* 1843 (2), S. 473–481.
- 31 Dorland's Medical Dictionary for Health Consumers (2007): Nondisjunction. Hg. v. Saunders. Online verfügbar unter <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Chromosomal+nondisjunction>, zuletzt geprüft am 09.07.2017.
- 32 Edelmann, L.; Pandita, R. K.; Spiteri, E.; Funke, B.; Goldberg, R.; Palanisamy, N.; Chaganti, R. S.; Magenis, E.; Shprintzen, R. J.; Morrow, B. E. (1999): A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. In: *Human molecular genetics* 8 (7), S. 1157–1167.

- 33 Emerson, E. (2003): Prevalence of psychiatric disorders in children and adolescents with and without intellectual disability. In: *Journal of intellectual disability research : JIDR* 47 (Pt 1), S. 51–58.
- 34 Field, M.; Tarpey, P. S.; Smith, R.; Edkins, S.; O'Meara, S.; Stevens, C.; Tofts, C.; Teague, J.; Butler, A.; Dicks, E.; Barthorpe, S.; Buck, G.; Cole, J.; Gray, K.; Halliday, K.; Hills, K.; Jenkinson, A.; Jones, D.; Menzies, A.; Mironenko, T.; Perry, J.; Raine, K.; Richardson, D.; Shepherd, R.; Small, A.; Varian, J.; West, S.; Widaa, S.; Mallya, U.; Wooster, R.; Moon, J.; Luo, Y.; Hughes, H.; Shaw, M.; Friend, K. L.; Corbett, M.; Turner, G.; Partington, M.; Mulley, J.; Bobrow, M.; Schwartz, C.; Stevenson, R.; Gecz, J.; Stratton, M. R.; Futreal, P. A.; Raymond, F. L. (2007): Mutations in the BRWD3 gene cause X-linked mental retardation associated with macrocephaly. In: *American Journal of Human Genetics* 81 (2), S. 367–374.
- 35 Flanigan, E. Y.; Aros, S.; Bueno, M. F.; Conley, M.; Troendle, J. F.; Cassorla, F.; Mills, J. L. (2008): Eye malformations in children with heavy alcohol exposure in utero. In: *The Journal of pediatrics* 153 (3), S. 391–395.
- 36 Flore, L. A.; Milunsky, J. M. (2012): Updates in the genetic evaluation of the child with global developmental delay or intellectual disability. In: *Seminars in pediatric neurology* 19 (4), S. 173–180.
- 37 França, L. T. C.; Carrilho, E.; Kist, T. B. L. (2002): A review of DNA sequencing techniques. In: *Quarterly reviews of biophysics* 35 (2), S. 169–200.
- 38 Gécz, J.; Shoubbridge, C.; Corbett, M. (2009): The genetic landscape of intellectual disability arising from chromosome X. In: *Trends in genetics* 25 (7), S. 308–316.
- 39 Gedeon, A.; Kerr, B.; Mulley, J.; Turner, G. (1994): Pericentromeric genes for non-specific X-linked mental retardation (MRX). In: *American journal of medical genetics* 51 (4), S. 553–564.
- 40 German Mental Retardation Network (MRNet) (2010): German Mental Retardation Network (MRNet). Online verfügbar unter http://www.german-mrnet.de/index_ger.html, zuletzt geprüft am 09.07.2017.
- 41 Gervasini, C.; Bentivegna, A.; Venturin, M.; Corrado, L.; Larizza, L.; Riva, P. (2002): Tandem duplication of the NF1 gene detected by high-resolution FISH in the 17q11.2 region. In: *Human genetics* 110 (4), S. 314–321.
- 42 Green, C. R.; Roane, J.; Hewitt, A.; Muhajarine, N.; Mushquash, C.; Sourander, A.; Lingley-Pottie, P.; McGrath, P.; Reynolds, J. N. (2014): Frequent behavioural challenges in children with fetal alcohol spectrum disorder: a needs-based assessment reported by caregivers and clinicians. In: *Journal of population therapeutics and clinical pharmacology* 21 (3), S. e405–e420.
- 43 Grisart, B.; Rack, K.; Vidrequin, S.; Hilbert, P.; Deltenre, P.; Verellen-Dumoulin, C.; Destrée, A. (2008): NF1 microduplication first clinical report: association with mild mental retardation, early onset of baldness and dental enamel hypoplasia? In: *European journal of human genetics* 16 (3), S. 305–311.
- 44 Grotto, S.; Drouin-Garraud, V.; Ounap, K.; Puusepp-Benazzouz, H.; Schuurs-Hoeijmakers, J.; Le Meur, N.; Chambon, P.; Fehrenbach, S.; van Bokhoven, H.; Frébourg, T.; de Brouwer, A. P. M.; Saugier-Verber, P. (2014): Clinical assessment of five patients with BRWD3 mutation at Xq21.1 gives further evidence for mild to moderate intellectual disability and macrocephaly. In: *European journal of medical genetics* 57 (5), S. 200–206.
- 45 Gu, C.; Barry, J. (2011): Function and mechanism of axonal targeting of voltage-sensitive potassium channels. In: *Progress in neurobiology* 94 (2), S. 115–132.
- 46 Gu, Y.; Gu, C. (2014): Physiological and pathological functions of mechanosensitive ion channels. In: *Molecular neurobiology* 50 (2), S. 339–347.

- 47 Hiscock, H.; Sciberras, E.; Mensah, F.; Gerner, B.; Efron, D.; Khano, S.; Oberklaid, F. (2015): Impact of a behavioural sleep intervention on symptoms and sleep in children with attention deficit hyperactivity disorder, and parental mental health: randomised controlled trial. In: *British Medical Journal (Clinical research ed.)* 350, S. h68.
- 48 Huang, J.; Zhu, T.; Qu, Y.; Mu, D. (2016): Prenatal, Perinatal and Neonatal Risk Factors for Intellectual Disability: A Systemic Review and Meta-Analysis. In: *PloS one* 11 (4), S. e0153655.
- 49 Isbrandt, D.; Leicher, T.; Waldschütz, R.; Zhu, X.; Luhmann, U.; Michel, U.; Sauter, K.; Pongs, O. (2000): Gene structures and expression profiles of three human KCND (Kv4) potassium channels mediating A-type currents I(TO) and I(SA). In: *Genomics* 64 (2), S. 144–154.
- 50 Jeanmougin, F.; Wurtz, J. M.; Le Douarin, B.; Chambon, P.; Losson, R. (1997): The bromodomain revisited. In: *Trends in biochemical sciences* 22 (5), S. 151–153.
- 51 Johnson, V. E. (2013): Revised standards for statistical evidence. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (48), S. 19313–19317.
- 52 Jones, K. L.; Smith, D. W.; Ulleland, C. N.; Streissguth, P. (1973): Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. In: *Lancet* 1 (7815), S. 1267–1271.
- 53 Juan-Mateu, J.; Rodríguez, M. J.; Nascimento, A.; Jiménez-Mallebrera, C.; González-Quereda, L.; Rivas, E.; Paradas, C.; Madruga, M.; Sánchez-Ayaso, P.; Jou, C.; González-Mera, L.; Munell, F.; Roig-Quilis, M.; Rabasa, M.; Hernández-Lain, A.; Díaz-Manera, J.; Gallardo, E.; Pascual, J.; Verdura, E.; Colomer, J.; Baiget, M.; Olivé, M.; Gallano, P. (2012): Prognostic value of X-chromosome inactivation in symptomatic female carriers of dystrophinopathy. In: *Orphanet journal of rare diseases* 7, S. 82.
- 54 Kalla, C.; Nentwich, H.; Schlotter, M.; Mertens, D.; Wildenberger, K.; Döhner, H.; Stilgenbauer, S.; Lichter, P. (2005): Translocation t(X;11)(q13;q23) in B-cell chronic lymphocytic leukemia disrupts two novel genes. In: *Genes Chromosomes Cancer* 42 (2), S. 128–143.
- 55 Karmiloff-Smith, A.; Al-Janabi, T.; D'Souza, H.; Groet, J.; Massand, E.; Mok, K.; Startin, C.; Fisher, E.; Hardy, J.; Nizetic, D.; Tybulewicz, V.; Strydom, A. (2016): The importance of understanding individual differences in Down syndrome. In: *F1000Research* 5.
- 56 Katsuki, F.; Goto, M.; Takagi, H.; Ozdemir, V.; Someya, T. (2006): Countertransference to psychiatric patients in a clinical setting: development of the Feeling Checklist-Japanese version. In: *Psychiatry and clinical neurosciences* 60 (6), S. 727–735.
- 57 Kaufman, L.; Ayub, M.; Vincent, J. B. (2010): The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. In: *Journal of neurodevelopmental disorders* 2 (4), S. 182–209.
- 58 Keeling, K. M.; Bedwell, D. M. (2011): Suppression of nonsense mutations as a therapeutic approach to treat genetic diseases. In: *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 2 (6), S. 837–852.
- 59 Kelleher, K. J.; McInerney, T. K.; Gardner, W. P.; Childs, G. E.; Wasserman, R. C. (2000): Increasing identification of psychosocial problems: 1979-1996. In: *PEDIATRICS* 105 (6), S. 1313–1321.
- 60 Khare, V.; Eckert, K. A. (2002): The proofreading 3'--5' exonuclease activity of DNA polymerases: a kinetic barrier to translesion DNA synthesis. In: *Mutation research* 510 (1-2), S. 45–54.
- 61 Kleefstra, T.; Schenck, A.; Kramer, J. M.; van Bokhoven, H. (2014): The genetics of cognitive epigenetics. In: *Neuropharmacology* 80, S. 83–94.
- 62 Kloosterman, W. P.; Hochstenbach, R. (2014): Deciphering the pathogenic consequences of chromosomal aberrations in human genetic disease. In: *Molecular cytogenetics* 7 (1), S. 100.

- 63 Landgraf, M. N.; Nothacker, M.; Heinen, F. (2013): Diagnosis of fetal alcohol syndrome (FAS): German guideline version 2013. In: *European journal of paediatric neurology : official journal of the European Paediatric Neurology Society* 17 (5), S. 437–446.
- 64 Le Scouarnec, S.; Gribble, S. M. (2012): Characterising chromosome rearrangements: recent technical advances in molecular cytogenetics. In: *Heredity* 108 (1), S. 75–85.
- 65 Lee, Y.; Jeoung, B. (2016): The relationship between the behavior problems and motor skills of students with intellectual disability. In: *Journal of exercise rehabilitation* 12 (6), S. 598–603.
- 66 Leite, A. J.; Pinto, I. P.; Cunha, D. M.; Ribeiro, C. L.; da Silva, C. C.; da Cruz, A. D.; Minasi, L. B. (2016): The Identification of Microdeletion and Reciprocal Microduplication in 22q11.2 Using High-Resolution CMA Technology. In: *BioMed research international* 2016, S. 7415438.
- 67 Leonard, H.; Wen, X. (2002): The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. In: *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 8 (3), S. 117–134.
- 68 Lorber, J.; Priestley, B. L. (1981): Children with large heads: a practical approach to diagnosis in 557 children, with special reference to 109 children with megalencephaly. In: *Developmental medicine and child neurology* 23 (4), S. 494–504.
- 69 Lozano, R.; Rosero, C. A.; Hagerman, R. J. (2014): Fragile X spectrum disorders. In: *Intractable & rare diseases research* 3 (4), S. 134–146.
- 70 Lubs, H. A.; Stevenson, R. E.; Schwartz, C. E. (2012): Fragile X and X-linked intellectual disability: four decades of discovery. In: *American Journal of Human Genetics* 90 (4), S. 579–590.
- 71 Mahdiah, N.; Rabbani, B. (2013): An overview of mutation detection methods in genetic disorders. In: *Iranian journal of pediatrics* 23 (4), S. 375–388.
- 72 Markoulatos, P.; Siafakas, N.; Moncany, M. (2002): Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. In: *Journal of clinical laboratory analysis* 16 (1), S. 47–51.
- 73 Mervis, C. A.; Decouflé, P.; Murphy, C. C.; Yeargin-Allsopp, M. (1995): Low birthweight and the risk for mental retardation later in childhood. In: *Paediatric and perinatal epidemiology* 9 (4), S. 455–468.
- 74 Miles, J. H.; Hadden, L. L.; Takahashi, T. N.; Hillman, R. E. (2000): Head circumference is an independent clinical finding associated with autism. In: *American journal of medical genetics* 95 (4), S. 339–350.
- 75 Müller, P.; Kутtenkeuler, D.; Gesellchen, V.; Zeidler, M. P.; Boutros, M. (2005): Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. In: *Nature* 436 (7052), S. 871–875.
- 76 Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1, S. 263–273.
- 77 Munir, K. M. (2016): The co-occurrence of mental disorders in children and adolescents with intellectual disability/intellectual developmental disorder. In: *Current opinion in psychiatry* 29 (2), S. 95–102.
- 78 Nazar, R. N.; Chen, P.; Dean, D.; Robb, J. (2010): DNA chip analysis in diverse organisms with unsequenced genomes. In: *Molecular biotechnology* 44 (1), S. 8–13.

- 79 Neuhauser, H.; Schienkiewitz, A.; Schaffrath Rosario, A.; Dortschy, R.; Kurth, B.-M. (2013): Referenzperzentile für anthropometrische Maßzahlen und Blutdruck aus der Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (KiGGS). Hg. v. Robert Koch-Institut. Online verfügbar unter www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownload/sB/KiGGS_Referenzperzentile.pdf?__blob=publicationFile, zuletzt geprüft am 09.07.2017.
- 80 Nevo, Y.; Kramer, U.; Shinnar, S.; Leitner, Y.; Fattal-Valevski, A.; Villa, Y.; Harel, S. (2002): Macrocephaly in children with developmental disabilities. In: *Pediatric neurology* 27 (5), S. 363–368.
- 81 Opitz, J. M.; Holt, M. C. (1990): Microcephaly: general considerations and aids to nosology. In: *Journal of craniofacial genetics and developmental biology* 10 (2), S. 175–204.
- 82 Peake, I. (1989): The polymerase chain reaction. In: *Journal of clinical pathology* 42 (7), S. 673–676.
- 83 Pearson Education, Inc. (2010): Microbiology - An Introduction. Chapter 8: Microbial Genetics. Online verfügbar unter <https://www.slideshare.net/menair/ch8-microbial-genetics>, zuletzt geprüft am 09.07.2017.
- 84 Piton, A.; Redin, C.; Mandel, J.-L. (2013): XLID-causing mutations and associated genes challenged in light of data from large-scale human exome sequencing. In: *American Journal of Human Genetics* 93 (2), S. 368–383.
- 85 Poduri, A.; Evrony, G. D.; Cai, X.; Walsh, C. A. (2013): Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. In: *Science (New York, N.Y.)* 341 (6141), S. 1237758.
- 86 Polanczyk, G.; de Lima, M. S.; Horta, B. L.; Biederman, J.; Rohde, L. A. (2007): The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. In: *The American journal of psychiatry* 164 (6), S. 942–948.
- 87 Portnoi, M. F. (2009): Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. In: *European journal of medical genetics* (52), S. 88–93.
- 88 Rasmussen, M.; Vestergaard, E. M.; Graakjaer, J.; Petkov, Y.; Bache, I.; Fagerberg, C.; Kibæk, M.; Svaneby, D.; Petersen, O. B.; Brasch-Andersen, C.; Sunde, L.. (2016): 17q12 deletion and duplication syndrome in Denmark-A clinical cohort of 38 patients and review of the literature. In: *American journal of medical genetics. Part A* 170 (11), S. 2934–2942.
- 89 Renieri, A.; Pescucci, C.; Longo, I.; Ariani, F.; Mari, F.; Meloni, I. (2005): Non-syndromic X-linked mental retardation: from a molecular to a clinical point of view. In: *Journal of cellular physiology* 204 (1), S. 8–20.
- 90 Ribeiro-Bicudo, L. A.; de Campos Legnaro, C.; Gamba, B. F.; Candido Sandri, R. M.; Richieri-Costa, A. (2013): Cognitive deficit, learning difficulties, severe behavioral abnormalities and healed cleft lip in a patient with a 1.2-mb distal microduplication at 22q11.2. In: *Molecular syndromology* 4 (6), S. 292–296.
- 91 Riley, E. P.; McGee, C. L. (2005): Fetal alcohol spectrum disorders: an overview with emphasis on changes in brain and behavior. In: *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 230 (6), S. 357–365.
- 92 Roeleveld, N.; Zielhuis, G. A.; Gabreëls, F. (1997): The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. In: *Developmental medicine and child neurology* 39 (2), S. 125–132.
- 93 Ropers, H. H. (2008): Genetics of intellectual disability. In: *Current opinion in genetics & development* 18 (3), S. 241–250.
- 94 Ropers, H. H. (2010): Genetics of early onset cognitive impairment. In: *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 11, S. 161–187.

- 95 Ropers, H. H.; Hamel, B. C. J. (2005): X-linked mental retardation. In: *Nature reviews. Genetics* 6 (1), S. 46–57.
- 96 Rosett, H. L. (1980): A clinical perspective of the Fetal Alcohol Syndrome. In: *Alcoholism, clinical and experimental research* 4 (2), S. 119–122.
- 97 Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In: *Science (New York, N.Y.)* 239 (4839), S. 487–491.
- 98 Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12), S. 5463–5467.
- 99 Schouten, J. P.; McElgunn, C. J.; Waaijer, R.; Zwiijnenburg, D.; Diepvens, F.; Pals, G. (2002): Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. In: *Nucleic acids research* 30 (12), S. e57.
- 100 Shaw-Smith, C.; Redon, R.; Rickman, L.; Rio, M.; Willatt, L.; Fiegler, H.; Firth, H.; Sanlaville, D.; Winter, R.; Colleaux, L.; Bobrow, M.; Carter, N. P. (2004): Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. In: *Journal of Medical Genetics* 41 (4), S. 241–248.
- 101 Shevchenko, A. I.; Zakharova, I. S.; Zakian, S. M. (2013): The evolutionary pathway of x chromosome inactivation in mammals. In: *Acta Naturae* 5 (2), S. 40–53.
- 102 Shevell, M.; Ashwal, S.; Donley, D.; Flint, J.; Gingold, M.; Hirtz, D.; Majnemer, A.; Noetzel, M.; Sheth, R. D. (2003): Practice parameter: evaluation of the child with global developmental delay: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and The Practice Committee of the Child Neurology Society. In: *Neurology* 60 (3), S. 367–380.
- 103 Simmonds, M. J.; Kavvoura, F. K.; Brand, O. J.; Newby, P. R.; Jackson, L. E.; Hargreaves, C. E.; Franklyn, J. A.; Gough, S. C. L. (2014): Skewed X chromosome inactivation and female preponderance in autoimmune thyroid disease: an association study and meta-analysis. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 99 (1), S. E127–31.
- 104 Smith, T. F.; Gaitatzes, C.; Saxena, K.; Neer, E. J. (1999): The WD repeat: a common architecture for diverse functions. In: *Trends in biochemical sciences* 24 (5), S. 181–185.
- 105 Suh, E. J.; Kabir, M. H.; Kang, U. B.; Lee, J. W.; Yu, J.; Noh, D. Y.; Lee, C. (2012): Comparative profiling of plasma proteome from breast cancer patients reveals thrombospondin-1 and BRWD3 as serological biomarkers. In: *Experimental & molecular medicine* 44 (1), S. 36–44.
- 106 Sun, R.; Liu, M.; Lu, L.; Zheng, Y.; Zhang, P. (2015): Congenital Heart Disease: Causes, Diagnosis, Symptoms, and Treatments. In: *Cell biochemistry and biophysics* 72(3), S. 857–60.
- 107 Tarpey, P. S.; Smith, R.; Pleasance, E.; Whibley, A.; Edkins, S.; Hardy, C.; O'Meara, S.; Latimer, C.; Dicks, E.; Menzies, A.; Stephens, P.; Blow, M.; Greenman, C.; Xue, Y.; Tyler-Smith, C.; Thompson, D.; Gray, K.; Andrews, J.; Barthorpe, S.; Buck, G.; Cole, J.; Dunmore, R.; Jones, D.; Maddison, M.; Mironenko, T.; Turner, R.; Turrell, K.; Varian, J.; West, S.; Widaa, S.; Wray, P.; Teague, J.; Butler, A.; Jenkinson, A.; Jia, M.; Richardson, D.; Shepherd, R.; Wooster, R.; Tejada, M. I.; Martinez, F.; Carvill, G.; Goliath, R.; de Brouwer, A. P.; van Bokhoven, H.; van Esch, H.; Chelly, J.; Raynaud, M.; Ropers, H. H.; Abidi, F. E.; Srivastava, A. K.; Cox, J.; Luo, Y.; Mallya, U.; Moon, J.; Parnau, J.; Mohammed, S.; Tolmie, J. L.; Shoubbridge, C.; Corbett, M.; Gardner, A.; Haan, E.; Rujirabanjerd, S.; Shaw, M.; Vandeleur, L.; Fullston, T.; Easton, D. F.; Boyle, J.; Partington, M.; Hackett, A.; Field, M.; Skinner, C.; Stevenson, R. E.; Bobrow, M.; Turner, G.; Schwartz, C. E.; Gecz, J.; Raymond, F. L.; Futreal,

- P. A.; Stratton, M. R. (2009): A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. In: *Nature Genetics* 41 (5), S. 535–543.
- 108 Thode, A.; Partington, M. W.; Yip, M. Y.; Chapman, C.; Richardson, V. F.; Turner, G. (1988): A new syndrome with mental retardation, short stature and an Xq duplication. In: *American journal of medical genetics* 30 (1-2), S. 239–250.
- 109 Triantaphyllopoulos, K. A.; Ikonopoulou, I.; Bannister, A. J. (2016): Epigenetics and inheritance of phenotype variation in livestock. In: *Epigenetics & chromatin* 9, S. 31.
- 110 Turner, G. (1996): Finding genes on the X chromosome by which homo may have become sapiens. In: *American Journal of Human Genetics* 58 (6), S. 1109–1110.
- 111 Valvo, G.; Novara, F.; Brovedani, P.; Ferrari, A. R.; Guerrini, R.; Zuffardi, O.; Sicca, F. (2012): 22q11.2 Microduplication syndrome and epilepsy with continuous spikes and waves during sleep (CSWS). A case report and review of the literature. In: *Epilepsy & behavior* 25 (4), S. 567–572.
- 112 van Bokhoven, H. (2011): Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. In: *Annual review of genetics* 45, S. 81–104.
- 113 van Ool, J. S.; Snoeijen-Schouwenaars, F. M.; Schelhaas, H. J.; Tan, I. Y.; Aldenkamp, A. P.; Hendriksen, J. G. M. (2016): A systematic review of neuropsychiatric comorbidities in patients with both epilepsy and intellectual disability. In: *Epilepsy & behavior : E&B* 60, S. 130–137.
- 114 Watson, C. T.; Marques-Bonet, T.; Sharp, A. J.; Mefford, H. C. (2014): The genetics of microdeletion and microduplication syndromes: an update. In: *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 15, S. 215–244.
- 115 Weise, A.; Mrasek, K.; Klein, E.; Mulatinho, M.; Llerena, J. C.; Hardekopf, D.; Pekova, S.; Bhatt, S.; Kosyakova, N.; Liehr, T. (2012): Microdeletion and microduplication syndromes. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 60 (5), S. 346–358.
- 116 Wentzel, C.; Fernström, M.; Ohrner, Y.; Annerén, G.; Thuresson, A.-C. (2008): Clinical variability of the 22q11.2 duplication syndrome. In: *European journal of medical genetics* 51 (6), S. 501–510.
- 117 Whibley, A. C.; Plagnol, V.; Tarpey, P. S.; Abidi, F.; Fullston, T.; Choma, M. K.; Boucher, C. A.; Shepherd, L.; Willatt, L.; Parkin, G.; Smith, R.; Futreal, P. A.; Shaw, M.; Boyle, J.; Licata, A.; Skinner, C.; Stevenson, R. E.; Turner, G.; Field, M.; Hackett, A.; Schwartz, C. E.; Gecz, J.; Stratton, M. R.; Raymond, F. L. (2010): Fine-scale survey of X chromosome copy number variants and indels underlying intellectual disability. In: *American Journal of Human Genetics* 87 (2), S. 173–188.
- 118 White, M.; Conroy, J.; Bullman, H.; Lever, M.; Daly, E.; Betts, D. R.; Cody, D.; Crolla, John A.; Lynch, S. A. (2013): Duplication of 17q11.2 and Features of Albright Hereditary Osteodystrophy Secondary to Methylation Defects within the GNAS Cluster: Coincidence or Causal? In: *Case reports in genetics* 2013, S. 764152.
- 119 Wikipedia (2017): Beispiele für Arten der Chromosomenmutation. Online verfügbar unter <https://de.wikipedia.org/wiki/Chromosomenmutation#/media/File:Chromosomenmutation.pn>, zuletzt geprüft am 09.07.2017.
- 120 World Health Organization (2012): The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders. Clinical descriptions and diagnostic guidelines (176-180). Online verfügbar unter www.who.int/classifications/icd/en/bluebook.pdf, zuletzt geprüft am 09.07.2017.

- 121 Wu, H.; Luo, J.; Yu, H.; Rattner, A.; Mo, A.; Wang, Y.; Smallwood, P. M.; Erlanger, B.; Wheelan, S. J.; Nathans, J. (2014): Cellular resolution maps of X chromosome inactivation: implications for neural development, function, and disease. In: *Neuron* 81 (1), S. 103–119.
- 122 Zarén, B.; Lindmark, G.; Bakketeig, L. (2000): Maternal smoking affects fetal growth more in the male fetus. In: *Paediatric and perinatal epidemiology* 14 (2), S. 118–126.
- 123 Zhang, X.; Snijders, A.; Segreaves, R.; Zhang, X.; Niebuhr, A.; Albertson, D.; Yang, H.; Gray, J.; Niebuhr, E.; Bolund, L.; Pinkel, D. (2005): High-resolution mapping of genotype-phenotype relationships in cri du chat syndrome using array comparative genomic hybridization. In: *American Journal of Human Genetics* 76 (2), S. 312–326.
- 124 Zubrick, S. R.; Kurinczuk, J. J.; McDermott, B. M.; McKelvey, R. S.; Silburn, S. R.; Davies, L. C. (2000): Fetal growth and subsequent mental health problems in children aged 4 to 13 years. In: *Developmental medicine and child neurology* 42 (1), S. 14–20.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Numerische Chromosomenaberrationen, modifiziert nach (Dorland's Medical Dictionary for Health Consumers 2007)	6
Abbildung 1.2 Strukturelle Chromosomenaberrationen, modifiziert nach (Wikipedia 2017)	7
Abbildung 1.3 Genmutationen, modifiziert nach (Pearson Education 2010).....	8
Abbildung 2.1 Patientendatei	14
Abbildung 2.2 Suchfunktion der Datenbank.....	15
Abbildung 2.3 Schema der einzelnen MLPA-Schritte, modifiziert nach (Schouten et al. 2002).....	23
Abbildung 3.1 Altersverteilung der untersuchten Patienten.....	25
Abbildung 3.2 Verteilung der Schweregrade der MR im Geschlechtervergleich	27
Abbildung 3.3 Verteilung der Untersuchungsmethoden	29
Abbildung 3.4 Anteil der Diagnostizierten im jeweiligen Untersuchungsjahr.....	29
Abbildung 3.5 Gesicherte genetische Veränderungen	31
Abbildung 3.6 Merkmale bei Alkoholkonsum während der Schwangerschaft.....	32
Abbildung 3.7 A: Stammbaum der Familie A; B und C: Fotos der Patienten	35
Abbildung 3.8 A: Stammbaum der Familie A; B: Gelelektrophoresebild (2%iges Agarosegel) nach PCR der Familie A, C: Sequenzen vom Exon 8 (Position 706-718) der Familie A	38
Abbildung 3.9 A: Stammbaum der Familie B; B: Foto des Indexpatienten.....	38
Abbildung 3.10 Gelelektrophoresebild (2,5%iges Agarosegel) nach Multiplex-PCR.....	39
Abbildung 3.11 A: Gelelektrophoresebild (1%iges Agarosegel) nach Long-Range-PCR; B: Stammbaum der Familie B	40
Abbildung 3.12 Gelelektrophoresebild (2%iges Agarosegel) nach PCR mit cDNA	40
Abbildung 3.13 Sequenzierungsergebnisse auf cDNA-Ebene	41
Abbildung 3.14 Stammbaum der Familie C.....	42
Abbildung 3.15 Sequenzierungsergebnisse der Familie C.....	43
Abbildung 3.16 Stammbaum der Familie D.....	44
Abbildung 3.17 MLPA-Ergebnisse des Indexpatienten (II.4), exemplarisch für II.1	45
Abbildung 3.18 MLPA-Ergebnisse der jüngsten Schwester (II.5), exemplarisch für I.1	45
Abbildung 3.19 MLPA-Ergebnisse der Mutter (I.2), exemplarisch für II.3.....	45
Abbildung 3.20 MLPA-Ergebnisse des ältesten Bruders (II.2).....	46
Abbildung 3.21 Stammbaum Familie D mit Darstellung der Ergebnisse der genetischen Diagnostik. 46	

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Einteilung der MR anhand des Intelligenzquotienten (World Health Organization 2012) ..	1
Tabelle 2.1 Klassifikation mentaler Retardierung, modifiziert nach (Zhang et al. 2005)	13
Tabelle 2.2 Anleitung zur Herstellung von Agarosegelen	18
Tabelle 3.1 Anzahl der Patienten mit Geschlechterverteilung, mittleres und medianes Alter je Untersuchungsjahr	26
Tabelle 3.2 Geschlechterverhältnis innerhalb der jeweiligen Schweregrade der MR	27
Tabelle 3.3 Anteil der Schweregrade der MR innerhalb der Altersgruppen	28
Tabelle 3.4 Schweregrad der MR entsprechend der Häufigkeit der Vorstellungen	28
Tabelle 3.5 Verteilung von Alkohol- und Zigarettenkonsum in der Schwangerschaft Betroffenen auf die Schweregrade der MR im Geschlechtervergleich	31
Tabelle 3.6 Verhaltensauffälligkeiten innerhalb der Schweregradgruppen bei beiden Geschlechtern .	33
Tabelle 3.7 Merkmale und Merkmalskombination aufgeteilt in Schweregrade der MR und Geschlecht	33
Tabelle 4.1 Vergleich der klinischen Daten bisher beschriebener Individuen mit einer Veränderung im BRWD3-Gen	56
Tabelle A.1 verwendete Geräte	79
Tabelle A.2 verwendete Verbrauchsmaterialien	81
Tabelle A.3 verwendete Chemikalien	82
Tabelle A.4 dNTP-Mix	83
Tabelle A.5 Ladepuffer	83
Tabelle A.6 5xTBE-Puffer	83
Tabelle A.7 TE-Puffer	83
Tabelle A.8 Tris-Hydrochlorsäure	83
Tabelle A.9 verwendete Primer des BRWD3-Gens	85
Tabelle A.10 verwendetet Primer des KCND1-Gens	85
Tabelle A.11 verwendete MLPA-Sonden für Familie D	86
Tabelle A.12 Cyclar-Programm „Erlangen65“	87
Tabelle A.13 Cyclar-Programm ABI SEQ_1min_5µl	87
Tabelle A.14 Cyclar-Programm Multiplex-PCR	87
Tabelle A.15 Cyclar-Programm Long-Range PCR	88
Tabelle A.16 Cyclar-Programm für die MLPA-PCR	88
Tabelle A.17 Master-Mix PCR	89
Tabelle A.18 Master-Mix Sequenzierung	89
Tabelle A.19 Primer-Mix für die Multiplex-PCR mit Fragmentlängen der verwendeten Exons	89

Tabelle A.20 Master-Mix Long-Range PCR.....	89
Tabelle A.21 Hybridisierungs-Mastermix MLPA.....	89
Tabelle A.22 Ligase-Mastermix MLPA.....	90
Tabelle A.23 Polymerase-Mastermix MLPA.....	90
Tabelle A.24 eigener Problemix MLPA.....	90
Tabelle A.25 Lade-Mix MLPA	90
Tabelle A.26 Software.....	91
Tabelle A.27 Datenbank.....	91
Tabelle A. 28 Entsprechung der in der Tabelle 4.1 verwendeten Bezeichnung der Betroffenen.....	92

9. Danksagung

Für die Bereitstellung aller zur Durchführung meiner Promotion erforderlichen Daten und Materialien danke ich dem Direktor des Instituts für Humangenetik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg Prof. Dr. med. M. Zenker.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. med. I. Schanze, die mich bei der Durchführung der Arbeit unterstützte und mir zu jeder Zeit mit fachlichem Rat und Tat helfend zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die meist problemlose Beschaffung der Patientenakten und für die Unterstützung bei der Arbeit im Labor, im Besonderen bei Dr. rer. nat. D. Schanze und René Rudat.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. F.-W. Röhl.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die mir ermöglicht haben meinen Studentraum auszuleben. Besonders für den emotionalen Rückhalt, sowohl während des Studiums als auch während des Verfassens der Dissertationsschrift, möchte ich mich bedanken.

Meinem Freund Hannes danke ich für seine so wie es scheint grenzenlose Geduld mit mir.

10. Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Retrospektive Charakterisierung von Patienten mit mentaler Retardierung/
Intelligenzminderung aus dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums
Magdeburg und molekulargenetische Aufarbeitung ausgewählter familiärer Fälle**

im Institut für Humangenetik

mit Unterstützung durch Frau Dr. med. Ina Schanze

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 09.07.2017

Jana Becker

11. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

12. Publikationen

Vorträge:

Schanze, I., Harakalova, M., Schanze, D., Becker, J., Muschke, P., Cuppen, E., Zenker, M.: **Intellectual Disability And Macrocephaly In Two Families Caused By Novel Mutations In *BRWD3***

In: 24th Annual Meeting, German Society of Human Genetics, Dresden, March 20-22, 2013

Schanze, I., Haraklova, M., Becker, J., Cuppen, E., Zenker, M.: **Intellectual Disability And Macrocephaly In Two Half-Brothers Caused By Novel Mutation In *BRWD3***

In: 23rd European Meeting on Dysmorphology, Strasbourg Le Bischenberg, September 6-7, 2012

in Arbeit:

Becker, J.[#]; Zirn, B.[#]; Schanze, D.; Harakalova, M.; Albrecht, B.; Böhrer-Rabel, H.; Kalscheuer, V.; Muschke, P.; Oeffner, F.; Rossier, E.; Tzschach, A.; Cuppen, E.; Zenker, M.; Küchler, A.[§]; Schanze, I.[§]: **Expanding the mutation spectrum of X-linked mental retardation with macrocephaly: identification of novel *BRWD3* variants and review of the literature.**

Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen: #, §

A) Anlagen

A.1 Geräte

Tabelle A.1 verwendete Geräte

Gerät	Marke	Hersteller
8-Kanal-Pipette	0,5-10 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
96-Well-Platten- Abdichtungsnoppenmatte für die Nutzung im Thermocycler	Thermowell Sealing Mat 96 well	Corning Inc., Corning, USA
Drucker für Gelbilder	Digital Monochrome Printer P93D	Misubishi, Tokyo, Japan
Elektrophoresekammer mit Gelträgern, Abstandshaltern, Kämmen für Probereservoir	Horizon 11-14/20-25 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus	Life Technologies, Carlsbad, USA
Elektrophoresestrom- versorgungsgerät	Consort Mini Electrophoresis Power Supply E143	Sigma Life Science, St. Louis, USA
Gel-Analyse-Gerät	DeVision DBOX with UV Transilluminator	Decon ScienceTec, Hohengandern, Deutschland
Magnetisches Rühr- und Heizgerät	RCT basic IKAMAG®	IKA, Staufen, Deutschland
Magnetplatte für Aufreinigungen	Agentcourt SPRIPlate®	Beckman Coulter, Brea, USA
Mikrowelle für Anfertigung von Agarosegelen	R-939 IN-A, 900 W, 40 l	Sharp, Osaka, Japan
Mikrozentrifuge	Heraus PICO17 Centrifuge	Thermo Fisher, Scientific, Waltham, USA
Mischgerät	Vortex Genie® 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Multipipette	Multipipette® stream	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten 0,2-2 µl; 2-20 µl; 20- 200 µl; 200-1000 µl	PIPETMAN	Gilson, Middleton, USA
Pipettierroboter für die Aufreinigung von PCR- und Sequenzierprodukten	Biomek NXp® Laboratory Automation Workstation	Beckman Coulter, Brea, USA
Sequenziergerät	24-capillary 3500xL Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermocycler für die MLPA- Reaktion	iCycler™ Thermalcycler	Bio-Rad, Hercules, USA
Thermocycler für die PCR- Reaktion (auch zur	VWR Duo cycler	VWR, Radnor, USA

Gerät	Marke	Hersteller
Denaturierung bei der MLPA genutzt)		
Thermocycler für die Sequenzierreaktion	Veriti 96 well Fast Thermo Cycler	Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Milli Q Reference Ultrapure Water Purification System	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge für Einzeltubes	miniSpin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge für Multitwell- Platen	Heraeus Labofuge 400	Thermo Fisher, Scientific, Waltham, USA

A.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle A.2 verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Marke	Hersteller
96-Well-Platte Fast für die Sequenzierreaktion	96 well Multiply Fast-PCR plate	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well-Platte für die Nutzung im Sequenziergerät	MicroAmp Optical 96 well-reaction plate	Applied Biosystems, Foster City, USA
96-Well-Platte für die PCR	96 Multiply PCR plate	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Handschuhe		MaiMed GmbH, Neuenkirchen, Deutschland
Multipipette Spitzen	Combitips plus® 0,2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Parafilm		Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Plattenabdeckungsfolie	Adhesive Plate Seals	Thermo Fisher, Scientific, Waltham, USA
Reaktionstubes 0,2 ml	PCR SoftTubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reaktionstubes 1,5 ml; 2,5 ml	SafeSeal 1,5 ml; 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

A.3 Chemikalien

Tabelle A.3 verwendete Chemikalien

Material	Bezeichnung	Hersteller
100 bp Größenstandard für die Elektrophorese	100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
1 kb Größenstandard für die Elektrophorese	1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
Agarose	UltraPure™ Agarose	Invitrogen, Carlsbad, USA
Betaine 5 M		Sigma Life Science, St. Louis, USA
Borsäure 100%		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMSO 5%		Sigma Life Science, St. Louis, USA
dNTPs	100 mM dNTP Set	Invitrogen, Carlsbad, USA
EDTA 0,5 M	EDTA Disodium Salt Dihydrate	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 100%		Zentralapotheke, Universitätsklinikum Magdeburg, Deutschland
Ethidiumbromid		Roche, Basel, Schweiz
Ficoll 400		Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
Formamid (100%)	Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems, Foster City, USA
Konzentrierte HCl	HCl 37%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LIZ 500 Größenstandard	Gene Scan™-500 LIZ™ Size Standard	Applied Biosystems, Foster City, USA
MLPA-Kit mit SALSA MLPA-Puffer, Ligase-65, Ligase-65 Puffer A, Ligase-65 Puffer B, SALSA PCR Primer-Mix: Mix aus 2 PCR-Primern, dNTPs, SALSA Polymerase	SALSA MLPA reagent kit	MRC Holland, Amsterdam, Niederlande
Orange G		Chemapol, Prag, Tschechische Republik
PCR-Aufreinigungsreagenz	Agentcourt AMPure®-reagent	Beckman Coulter, Brea, USA
PCR-Kit mit Taq DNA Polymerase, Rxn Puffer, MgCl ₂ 50mmol	Taq DNA Polymerase Recombinant	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sequenzierungsaufreinigungsreagenz	Agentcourt CleanSEQ-reagent	Beckman Coulter, Brea, USA
Sequenzierungs-Kit mit Big Dye und Sequenzierpuffer	Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Tris		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

A.4 Lösungen und Puffer

Tabelle A.4 dNTP-Mix

dNTP-Mix (2mM): für 5 ml	
Ingredienzien	Herstellungsanleitung
dCTPs, dTTPs, dGTPs, dATPS (100 mM), Millipore-Wasser	je 100 µl der dNTPs, auf 5 ml mit Millipore-Wasser auffüllen

Tabelle A.5 Ladepuffer

Ladepuffer: für 50 ml	
Ingredienzien	Herstellungsanleitung
7,5 g Ficoll 400, 1 ml EDTA, Millipore-Wasser, einige Gramm Orange G	Ficoll und EDTA mischen, mit Millipore-Wasser auf 50 ml auffüllen, Orange G hinzufügen, 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren, Nutzung des Überstandes

Tabelle A.6 5xTBE-Puffer

5x TBE-Puffer: für 1 l	
Ingredienzien	Herstellungsanleitung
54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 20 ml EDTA (0,5 M), destilliertes Wasser	Tris, Borsäure und EDTA mischen, mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen, zum Gebrauch auf 1x verdünnen

Tabelle A.7 TE-Puffer

TE-Puffer: für 1 l	
Ingredienzien	Herstellungsanleitung
10 ml Tris-Hydrochlorsäure (1 M), destilliertes Wasser	Tris-Hydrochlorsäure mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen

Tabelle A.8 Tris-Hydrochlorsäure

Tris-Hydrochlorsäure: für 1 l	
Ingredienzien	Herstellungsanleitung
121 g Tris, 700 ml Millipore-Wasser, 70 ml konzentrierte HCl, 20 ml EDTA (0,5 M), destilliertes Wasser	Tris, Millipore-Wasser, konzentrierte HCl und EDTA mischen, mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen

A.5 Erwähnte Gene

<i>ATRX</i>	ATRX (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked), chromatin remodeler
<i>BRWD3</i>	bromodomain and WD repeat domain containing 3
<i>EIF2B1</i>	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit alpha
<i>FMR1</i>	fragile X mental retardation 1
<i>GNAS</i>	GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) complex locus
<i>KCND1</i>	potassium voltage-gated channel subfamily D member 1
<i>MECP2</i>	methyl-CpG binding protein 2
<i>NF1</i>	neurofibromin 1
<i>UBE3A</i>	ubiquitin protein ligase E3A
<i>SNRPN</i>	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N

A.6 Primer

A.6.1 BRWD3-Gen

Tabelle A.9 verwendete Primer des BRWD3-Gens

Exon	Primer vorwärts Primer rückwärts	Fragmentlänge	Annealing Temperatur
4	gttgaggactgggacacagg cctttccgcctacaatgg	461 bp	60°C
8	ttggacaatgctttgttattgc gcagggtaggagcaaagtcc	557 bp	60°C
9-10	ggaaagttaaatagtcccttgaaa tcactttcacaactggatcg	1176 bp	60°C
14	ttgctatttaacatgcaccttg tagcagggtatagcgcgtgtc	402 bp	59°C
24	tgaattcacgtggtagtcaagg tgtgccaggacctacaaagg	593 bp	60°C
27	cccaaacaggtcagagaagg gccacacacaatgtgcataag	427 bp	60°C
32-33	tggaacacctttgacacactg gctgggtattcagccagatttc	566 bp	59°C
34	acactgttcccctccttcc ttcaccatgactcaactgg	497 bp	60°C
35	ggaaagaagcatttgttcctc aaagaaaggaaaggagaggtgag	532 bp	58°C
37	aagatgttttgggggtgtgg gcatgcctaacaagcaatcc	408 bp	60°C
34-35Fseq	agggacttatgagaaaatcaactg	453 bp	58°C

A.6.2 KCND1-Gen

Tabelle A.10 verwendetet Primer des KCND1-Gens

Exon	Primer vorwärts Primer rückwärts	Fragmentlänge	Annealing Temperatur
1	ctgctctgcctcctcatcc ctaagtctccctgggcttgg	496 bp	61°C

A.7 MLPA-Sonden

Tabelle A.11 verwendete MLPA-Sonden für Familie D

Name Exon	Lokalisation	rechte Hybridisierungssequenz linke Hybridisierungssequenz	Fragment- Länge
HCCS E6	Xp22.2	tgtggtccatcattgatccggtttgga gggaaagcaaaagagtattaccaagg	96
CDH2 E9	18q12.1	tgagaacagggtagacatcatagtagcta atctaactgtgaccgataaggatcaaccc	100
PTPRN2 E9	7q36.3	tcgactcttacctggagccctccctttgca aggccctcgacatggagaggaagaagtccg	104
RTN4R E2	22q11.21	gggtggcagccccatgccaggtgcctgcgtatgct acaatgagccccaagggtgacgacaagctgccccag	112
SLC6A4 E2	17q11.21	caatcccgacgatagagagctcggaggtgatccaaa atccaagcacccagagatcaattgggatccttggcag	116
CD8A E1	2p11.2	ctgacccctcaggagccgcggttcctggggtaacagt gggaaacgtgtcggccgtctccgctcaggcgcttgctgt	120
DIP2A E23	21q22.3	ccaggtgggcgtgtactgtctggccctggttcctgccaaca ccttgcccaaggctcctctcggagggttcacatttctgaa	124
SHH E2	7q36.3	cctggcggtggaggccggcttcgactgggtgtactacgagtccaa ggcacatatccactgctcgggtgaaagcaggtaagctggccctggc	132
SLC7A4 E2	22q11.21	ccttcggcttctccggcgtcatggccggcactgcctcctgcttctat gcttctgtgggcttcgacgtcattgccgcctccagtgaggaggccca	136

Universal-Primersequenz rechts:

gggttcctaagggttga

Universal-Primersequenz links:

tctagattggatcttgctggcac

A.8 Programme

Tabelle A.12 Cyclor-Programm „Erlangen65“

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl
1	94°C	3 min	1
2	94°C	30 sec	2
3	65°C	45 sec	
4	72°C	45 sec	
5	94°C	30 sec	2
6	63°C	45 sec	
7	72°C	45 sec	
8	94°C	30 sec	2
9	61°C	45 sec	
10	72°C	45 sec	
11	94°C	30 sec	2
12	59°C	45 sec	
13	72°C	45 sec	
14	94°C	30 sec	2
15	57°C	45 sec	
16	72°C	45 sec	
17	94°C	30 sec	31
18	55°C	45 sec	
19	72°C	45 sec	
20	72°C	10 min	1
21	12°C	∞	1

Tabelle A.13 Cyclor-Programm ABI SEQ_1min_5µl

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl
1	96°C	10 min	25
2	55°C	10 min	
3	60°C	1 h	
4	10°C	∞	1

Tabelle A.14 Cyclor-Programm Multiplex-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl
1	95°C	15 min	1
2	94°C	30 sec	35
3	57°C	90 sec	
4	72°C	90 sec	
5	72°C	10 min	1
6	10°C	∞	1

Tabelle A.15 Cyclor-Programm Long-Range PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl
1	92°C	2 min	1
2	92°C	10 sec	10
3	56°C	25 sec	
4	68°C	6 min, 30 sec	
5	92°C	10 sec	25
6	56°C	15 sec	
7	68°C	6 min, 30 sec	
8	68°C	7 min	1
9	10°C	∞	1

Tabelle A.16 Cyclor-Programm für die MLPA-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl
1	95°C	30 sec	35
2	60°C	30 sec	
3	72°C	60 sec	
4	72°C	20 min	1
5	15°C	∞	1

A.9 Master-Mixe, Primer-Mix, Probe-Mix, Lade-Mix

Tabelle A.17 Master-Mix PCR

Reagenzien	Menge in μl für 1 Exon
Wasser	5,6
Puffer-MgCl ₂	2,0
dNTP-Mix	2,0
DMSO 5%	1,0
Betaine 5 M	4,0
MgCl ₂ 50 mmol	0,6
Taq-Polymerase	0,1

Tabelle A.18 Master-Mix Sequenzierung

Reagenzien	Menge in μl für 1 Exon
Wasser	2,65
Puffer	1,00
Big Dye	0,25

Tabelle A.19 Primer-Mix für die Multiplex-PCR mit Fragmentlängen der verwendeten Exons

Primer-Mix	
Exon	Fragmentlänge
27	427 bp
4	461 bp
34	497 bp
35	532 bp
32-33	566 bp
24	593 bp

Tabelle A.20 Master-Mix Long-Range PCR

Reagenzien	Menge in μl
Wasser	10,3
Puffer 5x	5,0
dNTP-Mix 10 mM	1,25
DMSO 5%	1,25
Polymerase Enzym-Mix	0,7

Tabelle A.21 Hybridisierungs-Mastermix MLPA

Reagenzien	Menge in μl
Reference-Probemix 300	1,0
Eigener Probemix	0,5
MLPA-Puffer	1,5
mit dem Schüttelgerät gut mischen	

Tabelle A.22 Ligase-Mastermix MLPA

Reagenzien	Menge in μl
Ligase Puffer A	3,0
Ligase Puffer B	3,0
Ampuwa	25,0
mit dem Schüttelgerät gut mischen	
Ligase	1,0
gut mischen, auf Eis geben	

Tabelle A.23 Polymerase-Mastermix MLPA

Reagenzien	Menge in μl
SALSA PCR-Primer	1,0
SALSA Enzyme Dilution Buffer	1,0
Ampuwa	2,75
SALSA Polymerase	0,25
gut mischen, auf Eis	

Tabelle A.24 eigener Probemix MLPA

Reagenzien	Menge in μl
HCCS_ex6	0,8
CDH2_ex9	0,8
PTPRN2_ex9	0,8
RTN4R_ex2	0,8
SLC6A_ex2	0,8
CD8A_ex1	0,8
DIP2A_ex23	0,8
SHH_ex2	0,8
SLC7A4_ex2	0,8
Tris-EDTA	185,6

Tabelle A.25 Lade-Mix MLPA

Reagenzien	Menge in μl
LIZ 500 size standard	0,1
Hi-Di-Formamid	10

A.10 Software

Tabelle A.26 Software

Software	Hersteller
Primer 3	http://frodo.wi.mit.edu/
AGCT AMPure 96 Magdeburg_no dilution	Biomek
AGCT CleanSEQ Magdeburg No Transfer	Biomek
3500 Data Collection	Applied Biosystems
SEQUENCE Pilot	JSI medical systems
Stammbaumerstellung	http://pedigree.cegat.de/

Tabelle A.27 Datenbank

Datenbank	Internetadresse
Winter-Baraitser Dysmorphology Database	http://www.lmdatabases.com/
OMIM	http://www.omim.org/
NCBI PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/
UCSC BLAT	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start
Ensemble	http://www.ensembl.org/index.html
Human Genome Variation Society	http://www.hgvs.org/

A.11 Erklärung zu Tabelle 4.1

Tabelle A. 28 Entsprechung der in der Tabelle 4.1 verwendeten Bezeichnung der Betroffenen

Autor	Bezeichnung in der Dissertation	Bezeichnung in der Literatur
Field et al.	Familie 1	322
	Patient 1	III-6
	Patient 2	II-11
	Familie 2	336
	Patient 1	alt
	Patient 2	jung
Gedeon et al.	Familie 3	328
Grotto et al.	Familie 4	15709
	Patient 1	I
	Familie 5	W09-0806
	Patient 1	III-1
	Patient 2	III-2
	Patient 3	III-3
	Patient 4	III-5
Institut für Humangenetik	Familie 6	Familie A
	Patient 1	III.2
	Patient 2	III.1
	Familie 7	Familie B
	Patient 1	I.1